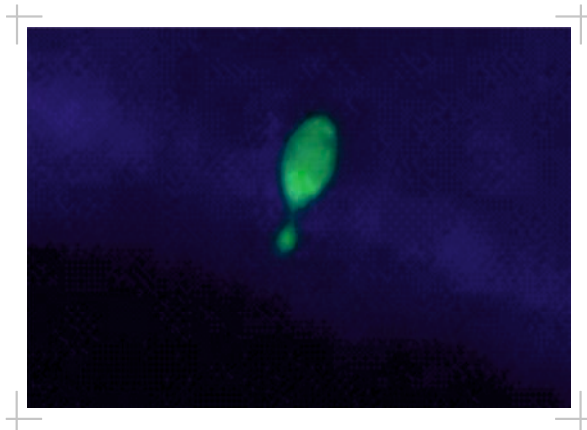


Eine cholinerge Zelle mit chemosensorischen Eigenschaften im Epithel der Konjunktiva der Maus

Stephanie Anna Martina Wiederhold



INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Eine cholinerge Zelle mit chemosensorischen
Eigenschaften im Epithel der Konjunktiva der Maus**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Stephanie Anna Martina Wiederhold

aus Rio de Janeiro, Brasilien

Gießen 2016

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen,
Arbeitsgruppe Kardiopulmonale Neurobiologie

Leiter: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Betreuer: Prof. Dr. Kummer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Stieger

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Bräuninger

Prüfungsmitglied: Prof. Dr. Dr. Alt

Tag der Disputation: 17.05.2016

Widmung

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Anatomie des Auges und der Augenlider	1
1.2	Die Tränendrüsen und ableitenden Tränenwege	2
1.3	Die Konjunktiva	2
1.4	Lymphatisches Gewebe der Konjunktiva	4
1.5	Nerven und Neuropeptide in der Konjunktiva	4
1.6	Cholinerge chemosensorische Zellen in der Mukosa von Säugetieren	6
1.6.1	Die kanonische Geschmackstransduktionskaskade	7
1.6.2	Non-neuronales Acetylcholin	8
1.7	Fragestellung und Ziel der Arbeit	10
2	MATERIAL UND METHODE	12
2.1	Versuchstiere	12
2.2	Probengewinnung	13
2.3	Probenverarbeitung	14
2.4	Immunhistochemie	14
2.5	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	16
3	ERGEBNISSE	18
3.1	Expression und Lokalisation von ChAT in der Konjunktiva der Maus	18
3.1.1	Epithelzellen unterschiedlicher Morphologie exprimieren ChAT	18
3.1.2	Zellen des CALT exprimieren ChAT	21

3.2	Expression und Lokalisation von ChAT in der äußeren Lidhaut der Maus	21
3.2.1	Haarschaftzellen exprimieren ChAT	21
3.3	Zytokeratine im Epithel der Mauskonjunktiva	23
3.3.1	Die Zytokeratine 5 und 10	23
3.3.2	Die Zytokeratine 8, 14 und 18	24
3.4	Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade in der Konjunktiva der Maus	26
3.4.1	ChAT-positive Epithelzellen	26
3.4.2	Zellen des CALT	27
3.5	Nervenfasern im Augenlid der Maus	27
3.5.1	Peptiderge und chRNA3-positive Nervenfasern in der Konjunktivalschleimhaut	27
3.5.2	Lagebeziehung der Nervenfasern zu cholinergen Epithelzellen	31
4	DISKUSSION	32
5	ZUSAMMENFASSUNG	47
6	SUMMARY	48
7	TABELLENVERZEICHNIS	49
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	49
9	LITERATURVERZEICHNIS	53
10	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	69
11	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	70
12	DANKSAGUNG	71

13	LEBENSLAUF	73
-----------	-------------------------	-----------

1 Einleitung

1.1 Anatomie des Auges und der Augenlider

Das Auge besteht aus dem Augapfel und seinen umgebenden Strukturen. Der Augapfel liegt zusammen mit den äußeren Augenmuskeln, dem Sehnerv, den Tränendrüsen, Blutgefäßen und Nervenfasern umgeben von Fett- und Bindegewebe in der knöchernen Augenhöhle. Nach ventral liegen dem Augapfel die Augenlider auf. Seine Funktion liegt in der Lichtwahrnehmung über die Netzhaut (Retina) (Welsch, 2003, Treuting, 2012). Die Augenlider bieten dem Auge Schutz, sowohl vor äußeren Einflüssen wie Licht und mechanischen Einwirkungen, als auch vor dem Austrocknen der Hornhaut. Durch den Lidschlag wird Tränenflüssigkeit verteilt, die die Augenvorderfläche reinigt und befeuchtet (Bragulla, 2009, Treuting, 2012). Während der Mensch zwei Augenlider vor jedem Auge besitzt, ist bei Mäusen neben dem Ober- und Unterlid auch ein kleineres drittes Augenlid, die sogenannte Nickhaut angelegt. Sie wird durch eine dünne Knorpelschicht in ihrem Innern stabilisiert (Treuting, 2012). Die Augenlider begrenzen die Lidspalte am inneren und äußeren Augenwinkel. Sowohl bei der Maus als auch beim Menschen bestehen die Augenlider aus vier Schichten. Die innerste Schicht besteht aus der palpebralen Konjunktiva. Diese liegt dem bindegewebigen Gerüst der Lider, Tarsus, an. Es wird auf der Vorderfläche von Skelettmuskel und der äußeren Haut bedeckt (Bragulla, 2009, Treuting, 2012). Die Epidermis ist zart und besteht histologisch bei beiden Spezies aus mehrschichtigem Plattenepithel. In der äußeren Haut befinden sich die Hautanhangsgebilde, zu denen unter anderem die Haarfollikel mit ihren dazugehörigen Talgdrüsen zählen. Der Haarfollikel setzt sich aus einem permanenten oberen Segment und einen transienten unteren Segment zusammen. Das permanente Segment unterteilt man in das Infundibulum (der Bereich zwischen der Epidermis und der Einmündung der Talgdrüse) und den Isthmus (der Bereich zwischen der Einmündung der Talgdrüse und dem Ansatz des Musculus arrector pili) (Treuting, 2012). Die Ansatzregion des Musculus arrector pili ist Sitz von neuroektodermalen Stammzellen und wird auch als Bulgeregion bezeichnet (Ohshima, 2007). Das transiente Segment beginnt unterhalb des Ansatzes des Musculus arrector pili (Treuting, 2012). Seine Größe und Form hängen von der Phase des Haarzyklus ab, in der sich der Haarfollikel befindet. In der anagenen Phase findet das Haarwachstum statt. Die

Katagenphase ist eine Ruhephase vor dem Übergang in die Telogenphase, in der sich der Haarfollikel zurückbildet (Treuting, 2012).

Eingebettet in den Tarsus befinden sich die Meibom-Drüsen (Jester et al., 1981). Diese Talgdrüsen tragen mit ihrem lipidhaltigen Sekret zur Stabilität des Tränenfilms bei (Bron et al., 2004). Jede Drüse wird aus mehreren Azini gebildet, deren Ausführungsgänge in einen großen Hauptausführungsgang münden. Dessen Öffnung liegt am Lidrand hinter dem mukokutanen Übergang (Jester et al., 1981). Meibom-Drüsen sind sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen vorhanden (Treuting, 2012). Sie werden durch sensorische, sympathische und parasympathische Fasern innerviert (Simons und Smith, 1994, Chung et al., 1996, Seifert und Spitznas, 1996, 1999, LeDoux et al., 2001). Manche Neurone, meist parasympathische Fasern, treten dabei in engen Kontakt mit der Basalmembran der Azini (Chung et al., 1996, Kirch et al., 1996, Perra et al., 1996, Seifert und Spitznas, 1996, 1999, LeDoux et al., 2001).

1.2 Die Tränendrüsen und ableitenden Tränenwege

Die Tränendrüsen produzieren den Großteil der wässrigen Tränenflüssigkeit. Mäuse besitzen im Gegensatz zum Menschen eine zusätzliche Tränendrüse, die Harder-Drüse. Die Ausführungsgänge befinden sich bei der Maus am lateralen Augenwinkel und beim Menschen im lateralen Fornix conjunctivae des Oberlids. Bei beiden Spezies strömt die Tränenflüssigkeit über die Oberfläche des Auges zum medialen Augenwinkel, wo sie über die Tränenpünktchen in die Tränenkanälchen abfließt. Über die Tränenkanälchen läuft die Tränenflüssigkeit zunächst in den Tränensack und anschließend über den Tränennasengang in den unteren Nasengang ab (Treuting, 2012).

1.3 Die Konjunktiva

Die Bindehaut (Konjunktiva) bedeckt die Hinterfläche der Augenlider und den Augensbulbus. Sie lässt sich in drei Bereiche unterteilen: die palpebrale Konjunktiva, die fornikale Konjunktiva und die bulbäre Konjunktiva. Charakteristisch für die Konjunktiva sind die im mehrschichtigen unverhornten Pattenepithel vorhandenen Becherzellen, die die innere Muzinschicht des Tränenfilms produzieren. Unter dem

Epithel liegt die Lamina propria, welche Blutgefäße, Nerven sowie Zellen des Immunsystems enthält. Je nach Lokalisation variieren der Aufbau des Epithels und die Dichte der Lamina propria. Die palpebrale Konjunktiva ist fest mit dem Augenlid verwachsen. Das Epithel hat mehr Schichten als das Epithel der fornikalen Konjunktiva und besitzt nur sehr wenige Becherzellen. Die fornikale Konjunktiva ist der Übergang zwischen bulbärer und palpebraler Konjunktiva und bildet viele Falten, die die Beweglichkeit des Augensbulbus in der Augenhöhle gewährleisten. Das Epithel in diesem Bereich hat viele Becherzellen und nur wenige Schichten. Auch mehrschichtiges prismatisches Epithel kommt hier stellenweise vor. Die bulbäre Konjunktiva liegt auf der Sklera und reicht bis zur Kornea. Ihr Epithel wird gebildet von mehrschichtig unverhorntem Plattenepithel ohne Becherzellen, das nahtlos in die Kornea übergeht (Lloyd et al., 2001, Lee et al., 2003, Welsch, 2003, Treuting, 2012).

Im Epithel der Konjunktiva wurden verschiedene Zytokeratine nachgewiesen (Krenzer und Freddo, 1997, Merjava et al., 2011). Zytokeratine gehören zu den Intermediärfilamenten und sind Bestandteile des Zytoskeletts. Die humanen Zytokeratine werden nach Moll in zwei Klassen unterteilt. Typ-I-Keratine sind sauer und umfassen die Zytokeratine 9-20 (CK9-CK20), Typ-II-Keratine sind basisch und umfassen die Zytokeratine 1-8 (CK1-CK8) (Moll et al., 1982, Moll, 1993). Angelehnt daran schlugen Schweizer et al. 2006 vor, Zytokeratine nicht-humaner Säugetierspezies, die ortholog zu menschlichen Zytokeratinen sind, mit gleichem Namen in die Nomenklatur aufzunehmen. Sie fügten außerdem die Typ-I-Zytokeratine 21-28 (CK21-28) zur Nomenklatur hinzu (Schweizer et al., 2006). Zytokeratine sind sehr zelltypspezifisch und können je nach Differenzierungsgrad einer Zelle variieren (Moll et al., 2008). Das hängt mit den unterschiedlichen Funktionen der verschiedenen Zytokeratine zusammen (Hutton et al., 1998). Dies macht man sich in der Tumordiagnostik bei der Bestimmung des Ursprungsgewebes (Winter et al., 1980, Schauer et al., 1984, Sundstrom und Stigbrand, 1994) und in der Forschung zur Identifizierung und Einordnung von Zellen zu Nutze (Panneck et al., 2014). In Zellen von humanem mehrschichtigem Plattenepithel wurden unter anderem CK5, CK10 und CK14 nachgewiesen (Moll et al., 1982). In basalen Zellschichten von verhorntem Plattenepithel können CK5 und CK14 nachgewiesen werden. Bei zunehmendem Verhornungsgrad wird die Transkription der entsprechenden Gene für CK 5 und CK14 eingestellt und CK10 wird exprimiert (Fuchs und Green, 1980, Roop et al., 1983,

Fuchs, 1996). Meist existieren mehrere Zytokeratine in einer Zelle und mehr als zehn verschiedene Zytokeratine konnten in einigen Geweben nachgewiesen werden (Moll et al., 1982). Die Verteilung der Zytokeratine bei der Maus scheint ähnlich zu der des Menschen zu sein (Winter et al., 1980, Schiller et al., 1982, Schweizer und Winter, 1982, Schweizer et al., 2006).

1.4 Lymphatisches Gewebe der Konjunktiva

Schleimhautassoziiertes Lymphgewebe befindet sich unter dem Überbegriff MALT (Mucosa associated lymphatic tissue) in der Lamina propria mucosae verschiedener Hohlorgane. Es dient dem immunologischen Schutz der Schleimhäute (Waldeyer, 2012). Das lymphatische Gewebe des Auges wird als eye associated lymphatic tissue (EALT) bezeichnet und durchzieht beim Menschen die Mukosa des Auges von der Tränendrüse zum medialen Kanthus und zieht bis in die ableitenden Tränenwege (Knop und Knop, 2003). Das konjunktiva-assoziierte lymphatische Gewebe (Conjunctiva associated lymphatic tissue; CALT) ist der konjunktivale Teil des EALT (Knop und Knop, 2000, 2005). Anders als beim Menschen ist das CALT bei der Maus weitgehend auf die Konjunktiva der Nickhaut begrenzt (Chodosh et al., 1998, Sakimoto et al., 2002, Steven et al., 2008). Beim Menschen wurden im CALT Anhäufungen von B-Zellen, Makrophagen, und follikulären dendritischen Zellen gefunden (Wotherspoon et al., 1994). Das Epithel über den Follikeln (follicle-associated Epithelium, FAE) besitzt keine Becherzellen (Sakimoto et al., 2002). T-Zellen sind um und in den Follikeln zu finden, IgA-produzierende Plasmazellen sind in der Nähe der Follikel in der Lamina propria vorhanden (Knop und Knop, 2000). Es gibt Hinweise darauf, dass die Zusammensetzung des CALT bei der Maus ähnlich ist, allerdings fehlen umfassende Studien (Sakimoto et al., 2002, Steven et al., 2008, Steven und Gebert, 2009).

1.5 Nerven und Neuropeptide in der Konjunktiva

Ins subepitheliale Stroma der humanen Konjunktiva gelangen sensible Neurone aus den Nervenästen des Nervus trigeminus, die die Augenlider versorgen (Nervus nasociliaris, Nervus lacrimalis, Nervus frontalis und Nervus infraorbitalis), und Neurone der Nervi ciliares breves. Die Nervi ciliares breves ziehen vom Ganglion ciliare mit sensiblen,

parasympathischen und sympathischen Fasern in das Auge (Duke-Elder, 1961, Bragulla, 2009). Auch bei Kaninchen (Karjalainen et al., 1978), Affen (Macintosh, 1974, Ruskell, 1985, Oduntan und Ruskell, 1992), Ratten (Luhtala et al., 1991, Luhtala und Uusitalo, 1991, Elsas et al., 1994) und Mäusen (Diebold et al., 2001) wurde eine sensorische, parasympathische und sympathische Innervation der Konjunktiva gezeigt. Diebold et al. konnten auch nachweisen, dass Nervenfasern in das Epithel der Mauskonjunktiva eindringen und zum Teil Becherzellen kontaktieren. Unter diesen intraepithelialen Nervenfasern waren sowohl für Vasoaktives Intestinalpeptid (VIP) immunreaktive parasympathische, als auch catecholaminerge (immunreaktiv für Tyrosinhydroxylase und Dopamin-beta-hydroxylase) sympathische Fasern (Diebold et al., 2001). Nervenfasern, die das Neuropeptid Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) enthalten, wurden im Epithel und in der Lamina propria der Rattenkonjunktiva nachgewiesen (Luhtala et al., 1991, Simons und Smith, 1994). CGRP wird durch dasselbe Gen wie Calcitonin kodiert und durch selektives Splicing der mRNA gebildet (Amara et al., 1982, Rosenfeld et al., 1984). Es ist sowohl im zentralen Nervensystem (Gibson et al., 1984, Tschopp et al., 1985) als auch in der Peripherie (Ghatei et al., 1985, Mulderry et al., 1985, Terenghi et al., 1985, Carstairs, 1987) verbreitet. In der Peripherie dient CGRP als starker Vasodilatator und kann dadurch die Blutzufuhr zu Organen oder Gewebeabschnitten regulieren (Fischer und Born, 1985, Tippins, 1986, Zaidi et al., 1987, Breimer et al., 1988, Preibisz, 1993, Wimalawansa, 1996). Zusammen mit anderen Neuropeptiden spielt CGRP eine Rolle bei der neurogenen Entzündung (Streilein et al., 2000, Holzmann, 2013). Dies wurde auch für das Auge nachgewiesen (Heino et al., 1995, Mantelli et al., 2010). Substanz P (SP) ist ein Neuropeptid aus elf Aminosäuren (Tregear et al., 1971). Es ist im Nervensystem von Säugetieren weit verbreitet und gehört zu der Gruppe der Tachykinine (Severini et al., 2002). SP wurde in sensorischen Neuronen, auch im Bereich des Auges nachgewiesen (Cuello et al., 1978, Miller et al., 1981). Luhtala et al. konnten SP-immunreaktive Nervenfasern in der Rattenkonjunktiva zeigen. Die meisten Fasern befanden sich in der Lamina propria, aber einige Fasern zogen in das Epithel hinein (Luhtala und Uusitalo, 1991). SP spielt ebenso wie CGRP eine zentrale Rolle bei der neurogenen Entzündung (Richardson und Vasko, 2002).

1.6 Cholinerge chemosensorische Zellen in der Mukosa von Säugetieren

In Schleimhäuten von Säugetieren wurden spezialisierte Epithelzellen nachgewiesen, die ein charakteristisches Büschel aus Mikrovilli tragen und deshalb oft als Bürstenzellen bezeichnet werden (Rhodin und Dalhamn, 1956, Luciano et al., 1968a, b, 1969, Höfer und Drenckhahn, 1992, Luciano und Reale, 1997, Sbarbati und Osculati, 2005). Sie besitzen Bestandteile der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade, sind cholinerg und lösen nach Stimulation Schutzreflexe aus (Tizzano et al., 2009, Krasteva et al., 2011). Zellen dieses Typs findet man in der Nasenschleimhaut (dort als Solitary Chemosensory Cells (SCCs) bezeichnet) (Tizzano et al., 2009, Saunders et al., 2014), dem Vomeronasalorgan der Maus (Ogura et al., 2010), in den unteren Atemwegen (Luciano et al., 1968a, Hijiya, 1978, Krasteva et al., 2011, Krasteva et al., 2012a), in der Urethra (Deckmann et al., 2014), im Magen-Darm-Trakt (Luciano et al., 1968b, Isomaki, 1973, Luciano und Reale, 1979) und in der Tuba auditiva (Krasteva et al., 2012b). Kürzlich wurde dieser Zelltyp auch im Thymus der Maus gefunden (thymic cholinergic chemosensory-like cells; thymic CCCs) (Panneck et al., 2014). Charakteristische Strukturproteine, die in einigen dieser Zellen exprimiert werden, sind die Zytokeratine CK8 und CK18 (Kasper et al., 1994, Höfer und Drenckhahn, 1996, Asan und Drenckhahn, 2005, Panneck et al., 2014). In vielen dieser chemosensorischen Epithelzellen wurde die Cholinacetyltransferase (ChAT), ein Enzym zur Acetylcholin-Synthese, nachgewiesen (Krasteva et al., 2011, Krasteva et al., 2012b, Deckmann et al., 2014, Panneck et al., 2014, Saunders et al., 2014). Acetylcholin (ACh), ursprünglich als klassischer Neurotransmitter verstanden, ist auch in Zellen außerhalb des Nervensystems weit verbreitet (Wessler und Kirkpatrick, 2008). Sowohl in den Atemwegen (tracheale Bürstenzellen und SCCs) als auch in der Urethra bilden diese cholinergen chemosensorischen Zellen Kontakte zu cholinozeptiven Nervenfasern (Krasteva et al., 2011, Deckmann et al., 2014, Saunders et al., 2014). In der Nase lösen bittere Substanzen (Denatonium, bakterielle Botenstoffe wie das *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing Molekül N-Acyl-Homoserin-Lacton) bei Mäusen trigeminal vermittelte Atempausen aus (Tizzano et al., 2009). Durch Inhalation des Bitterstoffs Cycloheximid und des bitteren bakteriellen Botenstoffs N-3-Oxododecanoyl-Homoserin-Lacton (ebenfalls ein *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing Molekül) in die unteren Atemwege werden ebenfalls respiratorische Reflexe bei

Mäusen ausgelöst (Krasteva et al., 2011, Krasteva et al., 2012a). Appliziert man den Bitterstoff Denatonium intraurethral bei Ratten, so wird reflexartig die Aktivität des Detrusormuskels der Blase erhöht und die Miktion eingeleitet (Deckmann et al., 2014). Im Vomeronasalorgan und in der Nase folgen außerdem lokale Entzündungsreaktionen und ein Anschwellen der Mukosa auf die lokale Applikation von Bitterstoffen (Ogura et al., 2010, Saunders et al., 2014). Bitterstoffe sind oft potenziell schädliche Substanzen, die der Körper trotz ihrer Heterogenität an der Geschmackssensation „bitter“ erkennt. Auch viele von Bakterien produzierte Substanzen binden an Bitterrezeptoren (Hettinger et al., 2007, Tizzano et al., 2009, Brockhoff et al., 2011, Krasteva et al., 2012a, Lee et al., 2012). Den cholinergen chemosensorischen Zellen der Schleimhäute wird deshalb eine Wächterfunktion an strategisch wichtigen Punkten des Körpers zugeschrieben. Es ist vorteilhaft, einen bakteriellen Kontakt dort schnell zu erkennen und bereits erste protektive Schritte einzuleiten, noch bevor Erreger in das Gewebe eindringen können (Ogura et al., 2010, Krasteva et al., 2011, Deckmann et al., 2014, Saunders et al., 2014). Die Funktion der Bürstenzelle im Thymus ist hingegen noch unklar (Panneck et al., 2014, Soultanova et al., 2015).

1.6.1 Die kanonische Geschmackstransduktionskaskade

Der Geschmackssinn im klassischen Sinne wird durch spezialisierte Zellen in Geschmacksknospen der Zunge vermittelt und umfasst die Kategorien süß, salzig, sauer, bitter und umami. Jede Geschmacksrichtung ist dabei einem bestimmten Zelltyp zugeordnet, der die Rezeptoren dafür trägt (Finger, 2005, Chandrashekar et al., 2006). Während „salzig“ und „sauer“ über Ionenkanäle detektiert werden, gehören die Rezeptoren für die Geschmacksrichtungen süß, bitter und umami zu der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (G-protein coupled receptors; GPCRs). Bisher konnten zwei Familien von Geschmacksrezeptoren unter den GPCRs identifiziert werden; T1Rs und T2Rs. Die Gruppe der T1Rs besteht aus drei Mitgliedern: T1R1, T1R2 und T1R3. Die Kombination von T1R2 und T1R3 bildet den Rezeptor für süß. T1R1 und T1R3 bilden den Rezeptor für umami. Die Gruppe der T2Rs (bitter) ist deutlich umfangreicher, da Bitterstoffe eine heterogene Gruppe bilden (Adler et al., 2000, Chandrashekar et al., 2000, Chandrashekar et al., 2006). Die Gene von humanen und murinen T2Rs können anhand der Nummerierung unterschieden werden. Die humanen

Gene werden mit Zahlen unter 100 beziffert (TAS2R1–TAS2R65), während murine Gene mit Ziffern über 100 versehen sind (Tas2r102–Tas2r146) (Bachmanov und Beauchamp, 2007). Es gibt etwa 30 verschiedene Bitterrezeptoren, aber jede Spezies besitzt eine unterschiedliche Anzahl an Bitterrezeptoren (Bachmanov und Beauchamp, 2007, Liman et al., 2014). Von vielen davon sind die Liganden noch nicht bekannt (Chandrashekar et al., 2006). Die Bindung an einen dieser Geschmacksrezeptoren löst eine charakteristische Signaltransduktionskaskade aus. Das an die Rezeptoren gekoppelte G-Protein besteht aus einer α -Untereinheit und ihren entsprechenden $\beta\gamma$ -Partnern. Eine charakteristische α -Untereinheit in Geschmacksrezeptoren ist α -Gustducin. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass auch noch andere α -Untereinheiten eine Rolle spielen (McLaughlin et al., 1992, McLaughlin et al., 1993). Bindet ein Ligand an einen dieser Geschmacksrezeptoren, so wird über das G-Protein die β_2 -Untereinheit der Phospholipase C (PLC β_2) aktiviert. Über die Umwandlung des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu den sekundären Botenstoffen 1,4,5-Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) und Bindung von IP₃ an den Typ III IP₃-Rezeptor (IP₃R3) wird intrazelluläres Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt (Behrens et al., 2011, Kinnamon, 2012). Dieses führt zur Öffnung des transmembranen Kationenkanals der Melastatin-Unterfamilie TRPM5 (Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 5) und so zur Membrandepolarisation und konsekutiven Freisetzung von Transmittermolekülen (Liman, 2007, Zhang et al., 2007). Da man die charakteristischen Signalmoleküle der Geschmackstransduktionskaskade (α -Gustducin, PLC β_2 , TRPM5) auch außerhalb der Geschmacksknospen der Zunge in den chemosensorischen Epithelzellen der Mukosa identifiziert hat, geht man von einem sehr ähnlichen oder gleichen Signalweg in diesen Zellen aus (Hoon et al., 1999, Zhang et al., 2003, Kaske et al., 2007, Liman, 2007, Kinnamon, 2012, Krasteva und Kummer, 2012).

1.6.2 Non-neuronales Acetylcholin

Ursprünglich glaubte man, dass ACh lediglich ein wichtiger Neurotransmitter im Nervensystem ist. Nach neueren Erkenntnissen spielt das Signalmolekül auch außerhalb des Nervensystems sowohl bei Bakterien und Pflanzen als auch bei Tieren und Menschen eine wichtige Rolle (Wessler und Kirkpatrick, 2008). Dieses cholinerge

System außerhalb des Nervensystems wird als „Non neuronales cholinerges System“ (NNCS) bezeichnet. Die Synthese von ACh erfolgt durch das Enzym ChAT aus Cholin und Acetylcoenzym A (Wessler und Kirkpatrick, 2008). Die Freisetzung kann vesikulär, über organische Kationen-Transporter (OCT) bzw. organische Kationen/Carnitin-Transporter (OCTN) oder über Mediatophore erfolgen (Wessler et al., 2001, Morel, 2003, Lips et al., 2005). Die Wirkung an der Zielzelle hängt von der Art des Rezeptors in der Zielzelle ab. Man unterscheidet muskarinerge und nikotinerge Rezeptoren. Muskarinerge Rezeptoren (mAChRs, Isoformen: M1-M5) sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die nach Muskarin, dem Gift des Fliegenpilzes *Amanita muscaria*, benannt wurden, das sie aktiviert (Starke, 1996). Nikotinerge Rezeptoren (nAChRs) sind Pentamere, die aus fünf Untereinheiten gebildet werden und ligandengesteuerte Ionenkanäle bilden. Nikotin aktiviert diese Rezeptoren und ist ihr Namensgeber (Langley, 1909, Patrick et al., 1987, Stroud et al., 1990, Cooper et al., 1991, Karlin, 2002). ACh kann im NNCS über die Acetylcholinesterase (AChE) und die Butyrylcholinesterase in die Abbauprodukte Cholin und Acetat gespalten und damit inaktiviert werden (Rosenberry, 1975, Darvesh et al., 2003). In der Haut wurde das NNCS zum ersten Mal beschrieben. Grando et al. wiesen 1993 die Synthese, die Freisetzung und den Abbau von ACh in humanen Keratinozyten nach (Grando et al., 1993). Auch im Epithel der Atemwege, im Darm- und Blasenepithel wurde ACh gefunden, ebenso in der Plazenta (Wessler und Kirkpatrick, 2008). Weitere Gewebe und Organe, in denen es Hinweise auf die Existenz eines NNCS gibt sind Herz, Niere, Ovarien, Drüsengewebe und Blutgefäße (Hecker et al., 2006, Wessler und Kirkpatrick, 2008). Auch Zellen des Immunsystems können cholinerg sein und cholinerge Rezeptoren besitzen (Sato et al., 1998). Proinflammatorische Effekte werden oft über mAChRs gesteuert (Kummer et al., 2008), während durch Bindung an nAChRs häufig antiinflammatorische Effekte hervorgerufen werden (Borovikova et al., 2000, Wang et al., 2003, Goncalves et al., 2011, Mabley et al., 2011). Sowohl B- als auch T-Lymphozyten können ChAT exprimieren und ACh produzieren (Fujii et al., 1996, Rinner et al., 1998).

Im Bereich des Auges ist non-neuronales ACh weit verbreitet und komplexe Zusammenhänge werden erst nach und nach verstanden (Duncan und Collison, 2003). Anticholinergika aus Extrakten der Tollkirsche (*Atropa belladonna*) wurden schon vor 2000 Jahren appliziert, um eine Erweiterung der Pupille hervorzurufen, damals vor

allem aus kosmetischen Gründen (Duncan und Collison, 2003). Später wurde Atropin, das Gift der Tollkirsche, zur Pupillendilatation bei Augenuntersuchungen verwendet. Eine Nebenwirkung der Applikation war der Anstieg des Augeninnendrucks. Aus dieser Erkenntnis heraus experimentierte man in den 60er Jahren mit ACh-ähnlichen Substanzen bzw. AChE-Hemmern zur Senkung eines erhöhten Augeninnendrucks, was wiederum das Risiko zur Entwicklung eines Katarakts birgt (Shaffer und Hetherington, 1966, Duncan und Collison, 2003). Aktuell wurde die Rolle von ACh bei der Regulation des Augeninnendrucks zur Therapie des Glaukoms wieder aufgegriffen (Wiederholt et al., 1996, Ellis et al., 2001). Zur Zeit ist bekannt, dass cholinerge Rezeptoren beim Wachstum des Augapfels (Gimbel, 1973, Lind et al., 1998), der Produktion der Tränenflüssigkeit (Dartt, 2001) und der Kataraktentwicklung in der Linse (Collison et al., 2000) eine Rolle spielen. Cholinozeptive Nervenfasern wurden im Epithel der Kornea nachgewiesen (Tanelian, 1991) und sowohl ACh als auch cholinerge Rezeptoren sind dort vorhanden (Van Alphen, 1957, Williams und Cooper, 1965, Wilson und McKean, 1986, Lind und Cavanagh, 1993, Grueb et al., 2006). Über die Konjunktiva ist bisher bekannt, dass ACh die Produktion von Mukus durch Becherzellen stimuliert (Tseng et al., 1987, Hodges et al., 2012, Contreras-Ruiz et al., 2013).

1.7 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Vor kurzem wurden spezialisierte cholinerge Zellen im Schleimhautepithel verschiedener Säugetierorgane entdeckt (Finger und Kinnamon, Sbarbati und Osculati, 2005). Diese Zellen verwenden Moleküle der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade zur Erkennung von potenziell schädlichen Substanzen im Lumen der Organe und lösen nach Stimulation protektive Reflexe aus (Finger et al., 2003, Tizzano et al., 2009, Krasteva et al., 2011, Deckmann et al., 2014). Diese Organe haben engen Kontakt zur Außenwelt und bilden deshalb potenzielle Eintrittspforten für Bakterien in den Körper (Nase, Tuba auditiva, Trachea, Magen-Darm-Trakt und Urethra) (Rhodin und Dalhamn, 1956, Höfer und Drenckhahn, 1992, Luciano und Reale, 1997, Finger et al., 2003, Tizzano et al., 2009, Krasteva et al., 2011, Krasteva et al., 2012b, Deckmann et al., 2014). Auch das Auge besitzt mit der Konjunktiva ein Epithel, das eng mit der Welt außerhalb des Körpers in Kontakt steht.

Ein Eindringen von Fremdkörpern oder Bakterien ist sowohl über die Luft als auch durch Berühren mit kontaminierten Körperteilen oder Gegenständen sehr leicht möglich und kann durch den Lidschluss nicht immer verhindert werden (Zegans et al., 2002, Azari und Barney, 2013). Es stellt damit nicht nur eine potenzielle Eintrittspforte für Bakterien in den Körper dar, sondern ist dadurch selbst als wichtiges sensorisches Organ gefährdet. Auch aus dem Nasenrachenraum könnten Infektionen über die ableitenden Tränenwege in das Auge vordringen. Das Vorhandensein dieser spezialisierten Epithelzellen ist daher sowohl in der Konjunktiva als auch in den ableitenden Tränenwegen vorstellbar.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Konjunktiva und die ableitenden Tränenwege der Maus auf das Vorhandensein spezialisierter cholinerg chemorezeptiver Epithelzellen zu untersuchen. Mit Hilfe eines Mausstammes, der grün fluoreszierendes Protein unter dem Promotor der ChAT exprimiert (Tallini et al., 2006), wurden cholinerge Epithelzellen identifiziert und immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen Moleküle der Geschmackstransduktionskaskade und Markermoleküle von chemosensorischen cholinergen Epithelzellen an ihnen durchgeführt. In dieser Arbeit gewonnene Erkenntnisse können helfen, die Entstehung von Infektionen und entzündlichen Erkrankungen des Auges besser zu verstehen, pharmakologische Targets zu entwickeln und Nebenwirkungen von Substanzen, die in das cholinerge System eingreifen oder Substanzen, die Bitterstoffe beinhalten, abzuschätzen.

2 Material und Methode

2.1 Versuchstiere

Zur Durchführung der Versuche wurden zwei verschiedene Stämme transgener Mäuse verwendet, ChAT(Bac)-eGFP-Mäuse (genetischer Hintergrund: C57Bl6; (Tallini et al., 2006)) und chrna3(Bac)-eGFP-Mäuse (genetischer Hintergrund: FVB/N-Swiss Webster; (Frahm et al., 2011)). Bei dem ChAT-eGFP-Mausstamm ist die Expression des Grünen-Fluoreszenz-Proteins (GFP) mittels der „Bacterial Artificial Chromosome“ (BAC)-Technologie mit dem Promotor des Syntheseezyms von ACh, ChAT, gekoppelt. Dadurch kann jede ChAT-produzierende Zelle im Fluoreszenzmikroskop aufgrund ihrer grünen Fluoreszenz identifiziert werden. Das BAC wird ungerichtet in das Genom integriert. Der endogene cholinerge Genlocus bleibt unverändert und funktionsfähig. Bei dem chrna3-eGFP-Mausstamm wurde ebenfalls mittels der BAC-Technologie die Expression von GFP mit dem Promotor der nikotinischen Rezeptoruntereinheit $\alpha 3$ gekoppelt. Dadurch können Zellen, die diese Rezeptoruntereinheit exprimieren, identifiziert werden.

Die Tiere wurden bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von zwölf Stunden in Käfigen gehalten und erhielten Wasser und Futter ad libitum. Die ChAT-eGFP-Mäuse wurden ursprünglich von der Cornell University bezogen (Cornell Center for Technology, Enterprise, and Commercialization, 20 Thornwood Drive, Suite 105, Ithaca, NY 148050-1265, USA). Die chrna3-eGFP-Mäuse waren ursprünglich eine Gabe von Prof. Nathaniel Heintz, Howard Hughes Medical Institute (Laboratory of Molecular Biology, 1230 York Avenue, New York, NY 10065-6399 USA) und Dr. Ines Tabanez-Tallon, Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine (Robert-Rössle-Str. 10, 13092 Berlin, Deutschland). Beide Linien wurden dann im Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen (Frankfurter Straße 105, 35392 Gießen, Justus-Liebig-Universität Gießen) gehalten und gezüchtet. Alle Versuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt (ChAT-eGFP-Mäuse: Tiertötungsanzeigennummer A 60/2012; Bewilligung am 18.12.2012, chrna3-eGFP-Mäuse: Tiertötungsmeldungsnummer 516_M; Bewilligung am 09.07.2014).

2.2 Probengewinnung

Die ChAT-eGFP-Mäuse wurden durch eine Überdosis Isofluran (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) getötet. Die chrna3-eGFP-Mäuse wurden durch Genickbruch getötet. Es wurden sowohl Augen (ChAT-eGFP-Maus: n=7, chrna3-eGFP-Maus: n=1) als auch ganze Köpfe (ChAT-eGFP-Maus: n=7; chrna3-eGFP-Maus: n=2) verwendet. Durch Perfusion wurden solche Tiere fixiert, deren Köpfe im Ganzen verwendet werden sollten. Die Entnahme der Augen erfolgte sowohl aus fixierten (n=3), als auch nicht fixierten Mäusen (n=5). Der Thymus wurde aus fixierten Mäusen entnommen. Zur Perfusionsfixierung wurde nach Eröffnung des Thorax das Herz freigelegt und das rechte Herzohr eingeschnitten. Über eine Kanüle im linken Ventrikel wurde der Kreislauf der Maus mit einer Vorspüllösung (25 g/l Polyvinylpyrrolidon MG 40000, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland; 5 g/l Procainhydrochlorid in Wasser, Merck, Darmstadt, Deutschland; 2 ml/l Heparin in Wasser, 10000 I. E., Ratiopharm, Ulm, Deutschland; pH 7,4; (Forssmann et al., 1977)) durchspült, um das Blut aus dem Kreislauf zu waschen. Anschließend erfolgte die Perfusion mit Zamboni-Fixans oder mit 4 % Paraformaldehyd [PFA] in 0,1 M Phosphatpuffer [PP] (bestehend aus 0,2 M Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat und 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, beides Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, in Aqua destillata, pH 7,4). Zamboni-Fixans besteht aus 2 % PFA (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 15 % gesättigter Pikrinsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 0,1 M PP, pH 7,4. Zur Entnahme des gesamten Kopfes wurden die Weichteile im Bereich des Halses durchtrennt und der Kopf im Atlantookzipitalgelenk abgesetzt. Die Augen wurden entnommen, indem die Haut periokulär durchtrennt wurde und subperiostal bis über den Orbitalrand präpariert wurde. Nach Mobilisation des Orbitainhalts wurde das Gewebe im Bereich des Sehnervs abgetrennt. Das Präparat umfasste somit neben der Konjunktiva den gesamten Bulbus und die periokuläre Haut. Für die Entnahme des Thymus wurden die Rippen beidseits mit den umgebenden Strukturen sowie die Claviculae durchtrennt und der ventrale Teil des knöchernen Thorax entfernt. Der Thymus wurde losgelöst und entnommen.

2.3 Probenverarbeitung

Gewebe von perfundierten Mäusen wurde für weitere fünf bis sechs Stunden im gleichen Fixans belassen. Frisch entnommenes Gewebe lag zur Immersion über Nacht bei Raumtemperatur in Zamboni-Fixans auf einer Wippe (Hecht-Assistent, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland). Die Präparate wurden mehrmals mit 0,1 M PP (pH 7,4) gewaschen. Der Knochen in den Köpfen wurde über zwei bis drei Wochen in einer Lösung bestehend aus 0,28 M TRIS Base (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 0,26 M Titriplex III (Merck Darmstadt, Deutschland) in destilliertem Wasser (pH 7,4) entkalkt. Das Erweichen des Knochens wurde zwischendurch mehrfach mit einer Präpariernadel geprüft. Nach dem Entkalken wurden die Köpfe zunächst für eine Stunde in Wasser gewaschen. Darauf folgend wurde das Gewebe in einer ansteigenden Konzentrationsreihe (9, 18 und 40 %) von Saccharose (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 0,1 M PP für mindestens einen Tag gelagert, bis es auf den Grund des Gefäßes sank. Die Augen wurden aufgrund ihrer geringeren Größe in einem Schritt über Nacht in Saccharose (18 %) gelagert. Die Proben wurden auf einem Stück Filterpapier (Whatman, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien) ausgerichtet und im Einbettmedium (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande) durch Eintauchen in stickstoffgekühltes Isopentan (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingefroren.

Es wurden Kryoschnitte in Serie mit einer Dicke von 14 µm angefertigt (Microm HM 560, MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland) und auf SuperFrost Plus Objektträger (Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgezogen.

2.4 Immunhistochemie

Die Schnitte wurden eine Stunde lang an der Luft getrocknet und anschließend mit einer Blocklösung aus 10 % Pferdeserum (PAA, Cölbe, Deutschland), 0,5 % Tween 20 und 0,1 % Rinderserumalbumin (BSA; beides Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) in Phosphatgepufferter Salzlösung [PBS] (0,005 M PP, pH 7,4, mit 0,45 % NaCl) inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Nach einer Stunde wurde diese Lösung entfernt und jeweils 100 µl des Primärantikörpers (siehe Tabelle 1), entsprechend der zuvor an Positivkontrollen ermittelten optimalen

Verdünnung, in PBS mit doppeltem Salzgehalt [PBS+S] über Nacht in einer feuchten, dunklen Kammer aufgebracht. Zur Kontrolle der Spezifität der Sekundärantikörper wurde jeweils eine Gruppe der Schnitte nur mit PBS+S statt der Primärantikörper versehen. Das Bindungsverhalten der Primärantikörper wurde zuvor an Positivkontrollen aus anderen Organen (Zunge, Rückenmark, Darm, Thymus) ausgetestet. Mit einer Pumpe wurden am nächsten Tag die Lösungen abgesaugt und die Objektträger zur Entfernung überschüssiger Antikörper für zwei mal zehn Minuten in einer Küvette mit PBS gewaschen. Als Nächstes wurden die Schnitte für eine Stunde mit dem in PBS+S verdünnten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2) in einer dunklen und feuchten Kammer inkubiert. Es wurden fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper verwendet, die gegen die speziesabhängigen Immunglobulin-Antigene gerichtet sind, um die Lokalisation der Antikörperbindung sichtbar zu machen. Nach erneutem Absaugen und Waschen der Schnitte für zwei mal zehn Minuten in PBS folgte eine Nachfixierung in 4 % PFA für zehn Minuten und abermaliges Waschen. Vor dem Bedecken mit Deckgläsern wurden die Präparate mit 30 µl Carbonat-gepuffertem Glycerol (1:1; pH 8,6) benetzt. Es wurden sowohl Einfachmarkierungen mit nur einem Antikörper durchgeführt als auch Doppel- und Dreifachmarkierungen. Für die Doppel- bzw. Dreifachmarkierung wurde das grün fluoreszierende Signal des GFP durch einen Primärantikörper gegen GFP und dem entsprechenden FITC-gekoppelten Anti-Huhn-IgY verstärkt. Das zweite Antigen wurde mit einem an Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Wurde ein drittes Antigen eingesetzt, so wurde es mit dem Fluorophor Cy5 gekennzeichnet. Dafür wurde ein zusätzlicher Inkubationsschritt benötigt. Die Schnitte wurden zunächst nach oben beschriebenem Protokoll behandelt. Nach einstündiger Inkubation mit der Blocklösung, zwei Waschschritten und der Inkubation mit den Primärantikörpern über Nacht erfolgte der Zwischenschritt. Die Präparate wurden mit einem in PBS+S verdünnten Biotin-konjugierten Sekundärantikörper gegen die mit Cy5 zu markierende speziesabhängigen Immunglobulin-Antigene für eine Stunde in einer dunklen und feuchten Kammer inkubiert. Nach Absaugen der Schnitte und Waschen in PBS für zwei mal zehn Minuten wurden die Präparate dann für eine Stunde in einer dunklen, feuchten Kammer mit den in PBS+S verdünnten fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern und dem in PBS+S verdünnten Tertiärreagenz (Cy5-konjugiertes Streptavidin zur Bindung an das Biotin) inkubiert. Anschließend wurde das Protokoll wie oben beschrieben zur Nachfixierung

der Schnitte und dem Eindeckeln fortgeführt. Alle Objektträger wurden im Dunkeln bei +4° C aufbewahrt und mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Antigen	Wirtsspezies	Code/Klon	Verdünnung	Quelle
CGRP	Ziege, p	BT17-2090-07	1:4000	Biotrend, Köln, Deutschland
CK8	Kaninchen, m	SP102/M4020	1:50	Spring Bioscience, Pleasanton, USA
CK18	Kaninchen, m	SP69/M3690	1:200	Spring Bioscience, Pleasanton, USA
GFP	Huhn, p	NB 100-1614	1:16,000	Novus Biologicals, Littleton, USA
Gα-gustducin	Kaninchen, p	Sc-395	1:3000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
PLCβ2	Kaninchen p	Sc-206	1:800	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
SP	Ratte, m	NC1/34HL	1:1500	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
TRPM5	Kaninchen, p	-	1:1000	(Kaske et al., 2007)

Tabelle 1: Für immunhistochemische Markierungen verwendete Primärantikörper
m=monoklonal, p=polyklonal

2.5 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Die Auswertung erfolgte an einem Epifluoreszenzmikroskop (Axioplan 2 Imaging mot, Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland). Die verwendeten Filter sind in Tabelle 3 aufgeführt. FITC leuchtet grün, Cy3 orange und Cy5 infrarot. Markierte Bereiche wurden aufgesucht und mit Hilfe des Programms Axio Vision 4.8.2 (Carl Zeiss Vision GmbH, Göttingen, Deutschland) fotografiert und auf einem Computer gespeichert. Da

das Fluorophor Cy5 infrarot leuchtet, wurde die Markierung mit diesem Farbstoff in schwarzweiß dokumentiert. Je mehr Fluorophor gebunden wurde, desto größer ist die Intensität und desto heller erscheint dieser Bereich im Bild. Zur besseren Unterscheidung wurde diesem Signal bei der gleichzeitigen Darstellung mehrerer Signale die Farbe rot zugewiesen.

Bei der Beurteilung der Schnitte wurde darauf geachtet, dass das Gewebe intakt war und die Zellen und Strukturen sauber angefärbt wurden. Das FITC-verstärkte ChAT-eGFP-Signal war zum Teil so stark, dass bei Verwendung des entsprechenden Filtersystems für das Fluorochrom FITC lediglich die FITC-markierten Strukturen erkennbar waren, aber nicht das umliegende Gewebe. In diesen Fällen wurde zur Darstellung des umliegenden Gewebes zusätzlich mithilfe eines Filtersystems fotografiert, dessen Fluorochrom bei der entsprechenden Immunhistochemie nicht verwendet wurde (Cy3 oder DAPI). Dadurch fluoreszierte das gesamte Gewebe schwach in der Farbe des zum entsprechenden Filtersystems gehörenden Fluorochroms. Die Bearbeitung der Bilder wurde mit PowerPoint durchgeführt und war auf die flächenhafte Anpassungen der Helligkeit und des Kontrastes beschränkt.

Fluorochrom	Anregungsfilter (nm)	Dichroischer Spiegel (nm)	Sperrfilter (nm)
DAPI	340-380	400	435-685
FITC	460-490	505	515-550
Cy3	525-556	555	570-650
Cy5	590-650	655	665-746

Tabelle 2: Verwendete Fluorochrome und Fluoreszenzfilter für die Epifluoreszenzmikroskopie

3 Ergebnisse

3.1 Expression und Lokalisation von ChAT in der Konjunktiva der Maus

3.1.1 Epithelzellen unterschiedlicher Morphologie exprimieren ChAT

Im Epithel der Konjunktiva konnten verschiedene Arten von ChAT-positiven Zellen nachgewiesen werden. Im Bereich der gesamten Konjunktiva fanden sich rundliche ChAT-positive Zellen. Diese befanden sich häufig nahe der Basalmembran und lagen oft in kleinen Gruppen beieinander (Abbildungen 1a und 1b). Im fornikalen, aber weder im palpebralen noch im bulbären Teil der Konjunktiva waren vereinzelt schlanke ChAT-positive Zellen (Abbildungen 1c und 1d) nachweisbar. Die meisten von ihnen befanden sich im Bereich des medialen Augenwinkels. Durch ihre spindel- oder birnenförmige Form grenzten sie sich von dem anderen, rundlichen ChAT-positiven Zelltyp ab. Meist besaßen sie einen apikalen und/oder basalen Fortsatz. Das ChAT-eGFP-Signal war bei diesen Zellen sehr stark, so dass sie auch bei geringeren Vergrößerungen identifiziert werden konnten (Abbildung 1e), während der andere ChAT-positive Zelltyp erst bei höheren Vergrößerungen erkennbar wurde.

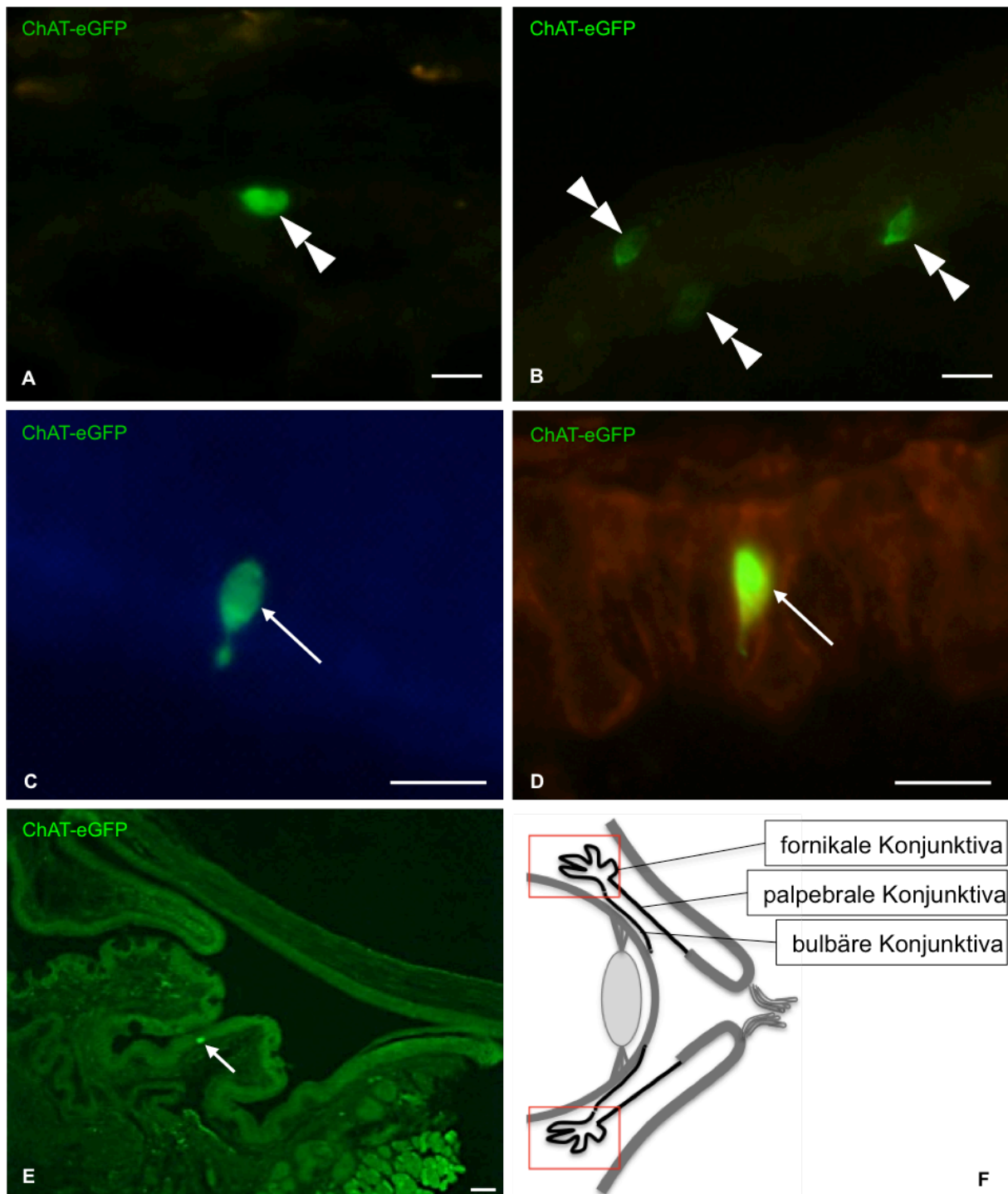


Abbildung 1: ChAT-eGFP-Expression in der murinen Konjunktiva; zur besseren Darstellung des Hintergrundes wurden zum Teil zusätzliche Fluoreszenzfilterkombinationen verwendet (A, D: Fluoreszenzfilterkombination für Cy3; C: Fluoreszenzfilterkombination für DAPI) **A, B** Rundliche ChAT-eGFP-positive Zellen im Epithel der Konjunktiva (Doppelpfeilköpfe); **C-E** Schlanke, spindelförmige ChAT-eGFP-positive Zellen im Epithel der Konjunktiva (Pfeile); **E** Fornix conjunctivae mit ChAT-eGFP-positiver Zelle (Pfeil); **F** Schematische Darstellung des Auges, sagittale Ansicht; schlanke, spindelförmige Zellen im Epithel der Konjunktiva wurden im Bereich der fornikalen Konjunktiva (durch roten Kasten eingerahmt) gefunden; Balken A, B, C, D: 20 μ m, Balken E: 50 μ m

Die schlanken, birnen- oder spindelförmigen Zellen konnten weder in den Tränenkanälchen, noch im Tränensack oder im Tränennasengang nachgewiesen werden (Abbildung 2). In der Schleimhaut der angrenzenden Nasennebenhöhlen waren zahlreiche ChAT-positive SCC zu erkennen.

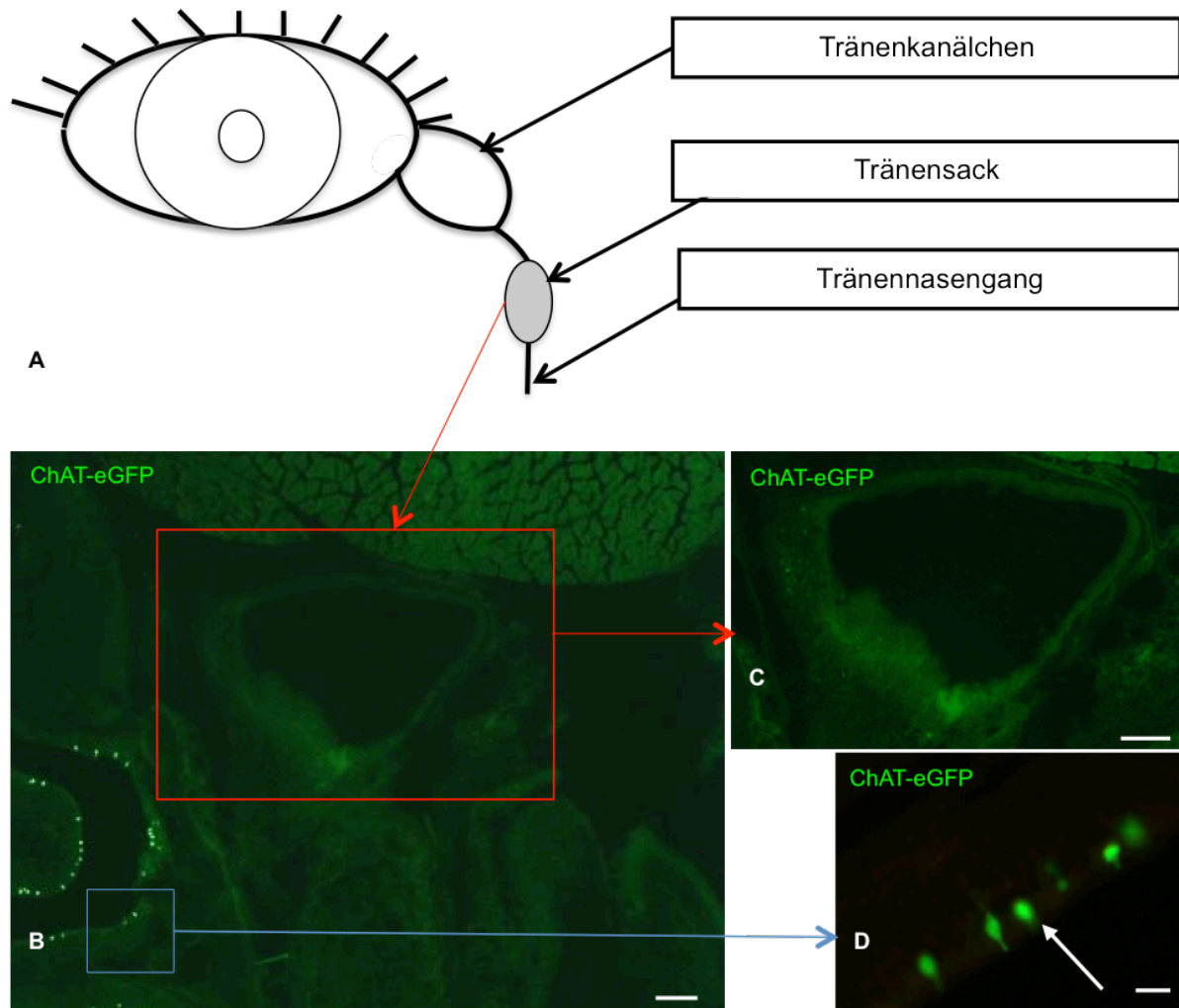


Abbildung 2: ChAT-eGFP-Expression in den ableitenden Tränenwegen und Nasennebenhöhlen. **A** Schematische Abbildung des Auges und der ableitenden Tränenwege, Coronalebene. **B** Coronarer Schnitt durch den Schädel einer ChAT-eGFP-Maus (roter Kasten: Tränensack; blauer Kasten: Nasennebenhöhlenschleimhaut). **C** Tränensack in höherer Vergrößerung ohne ChAT-eGFP-positive Zellen. **D** SCC der Nasennebenhöhle; Balken A, B: 50 μ m, Balken C: 20 μ m

3.1.2 Zellen des CALT exprimieren ChAT

Follikulär organisiertes lymphatisches Gewebe der Konjunktiva wurde nur im Bereich der Membrana nictitans gefunden. Im CALT befanden sich Gruppen von runden ChAT-positiven Zellen neben ChAT-negativen Zellen. Diese waren rundlich und von ähnlicher Form wie die rundlichen ChAT-positiven Zellen im Epithel der Konjunktiva (Abbildung 3).

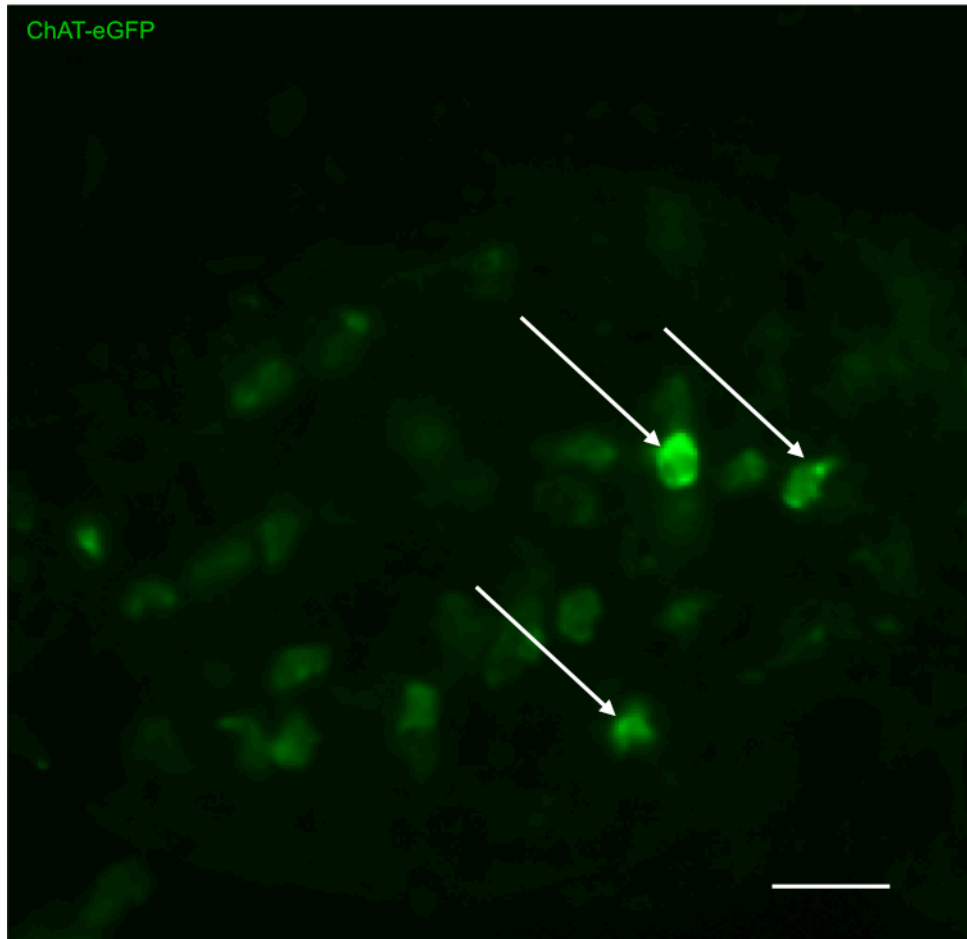


Abbildung 3: ChAT-eGFP-positive Zellen des CALT (Pfeile); Balken: 20 μ m

3.2 Expression und Lokalisation von ChAT in der äußeren Lidhaut der Maus

3.2.1 Haarschaftzellen exprimieren ChAT

In Haarschaftzellen der Lidhaut der Maus waren im Bereich der Einmündung der Talgdrüsen in den Haartrichter starke ChAT-eGFP-Signale erkennbar (Abbildung 4). In

Keratinocyten der Haut von ChAT-eGFP-Mäusen waren dagegen keine Signale nachweisbar.

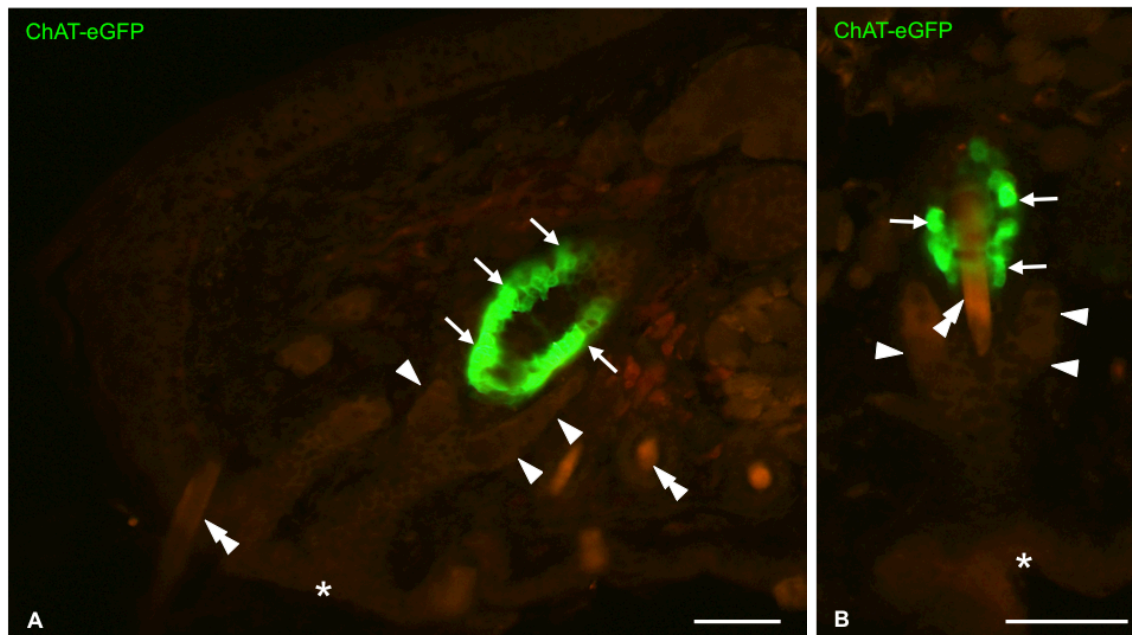


Abbildung 4 Querschnitte durch die Augenlider von ChAT-eGFP-Mäusen; zur besseren Darstellung des Hintergrundes wurde zusätzlich die Fluoreszenzfilterkombination für Cy3 verwendet. Haarschaftzellen (Pfeile) exprimieren ChAT. In direkter Nachbarschaft befinden sich die Einmündungen der Talgdrüsen (Pfeilköpfe); Die Lidoberfläche wird durch Sternchen markiert. Die Haarschäfte (Doppelpfeilköpfe) leuchten durch Autofluoreszenz. **A** Querschnitt des Lids im Bereich der Lidkante mit ChAT-eGFP-positiven Haarbalgzellen (Pfeile). **B** Querschnitt des Lids; Haarschaft (Doppelpfeilkopf) umgeben von ChAT-eGFP-positiven Haarschaftzellen (Pfeile); Balken A, B: 50 μ m

3.3 Zytokeratine im Epithel der Mauskonjunktiva

3.3.1 Die Zytokeratine 5 und 10

Zytokeratin 5 konnte in den Basalzellen des Epithels der Konjunktiva nachgewiesen werden, war aber nicht mit ChAT-eGFP-Fluoreszenz kolokalisiert (Abbildung 5a). Zytokeratin 10-Antikörper haben keine Markierung im Epithel der Mauskonjunktiva hervorgerufen. Nur das verhornte Plattenepithel der Lidhaut war immunreaktiv für Zytokeratin 10. Das verhornte Plattenepithel der Maus war ChAT-eGFP-negativ (Abbildungen 5b und c).

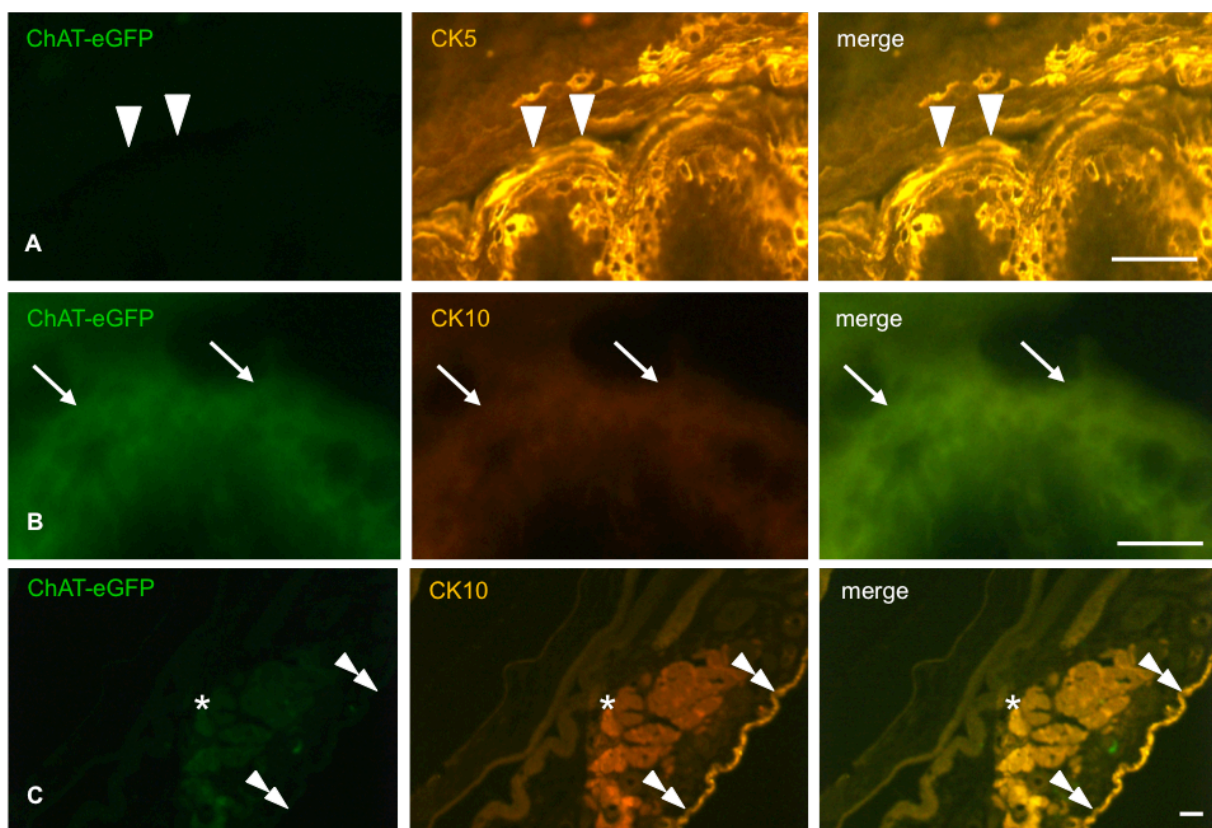


Abbildung 5: Immunhistochemie der Konjunktiva mit Antikörpern gegen Zytokeratine. **A** CK5 im Epithel der Mauskonjunktiva, keine Kolokalisation mit ChAT-eGFP-Signal (Pfeilköpfe zeigen auf die Oberfläche der Konjunktiva); **B** CK10 ist im Epithel der Konjunktiva nicht nachweisbar (Pfeile zeigen auf die Oberfläche der Konjunktiva). **C** CK10 im verhornten Plattenepithel des Oberlids der Maus (Doppelpfeilköpfe), Autofluoreszenz im Muskel (Sternchen); Balken: 50 µm

3.3.2 Die Zytokeratine 8, 14 und 18

Die schlanken, ChAT-positiven spindel- oder birnenförmigen Zellen der fornikalen Konjunktiva waren immunreaktiv für Zytokeratin 8 (Abbildung 6a). Vereinzelt fanden sich lange schlanke Zytokeratin 8-positive, aber ChAT-eGFP-negative Zellen mit langen basalen Fortsätzen in der Konjunktiva (Abbildung 6b). Zytokeratin 18 war im Epithel der Mauskonjunktiva nicht nachweisbar (Abbildung 6c), aber sowohl in ChAT-eGFP-positiven als auch in ChAT-eGFP-negativen Zellen des Thymus (Abbildung 6e). Zytokeratin 14 war in ChAT-eGFP-negativen basalen Zellen der Mauskonjunktiva nachweisbar (Abbildung 6d).

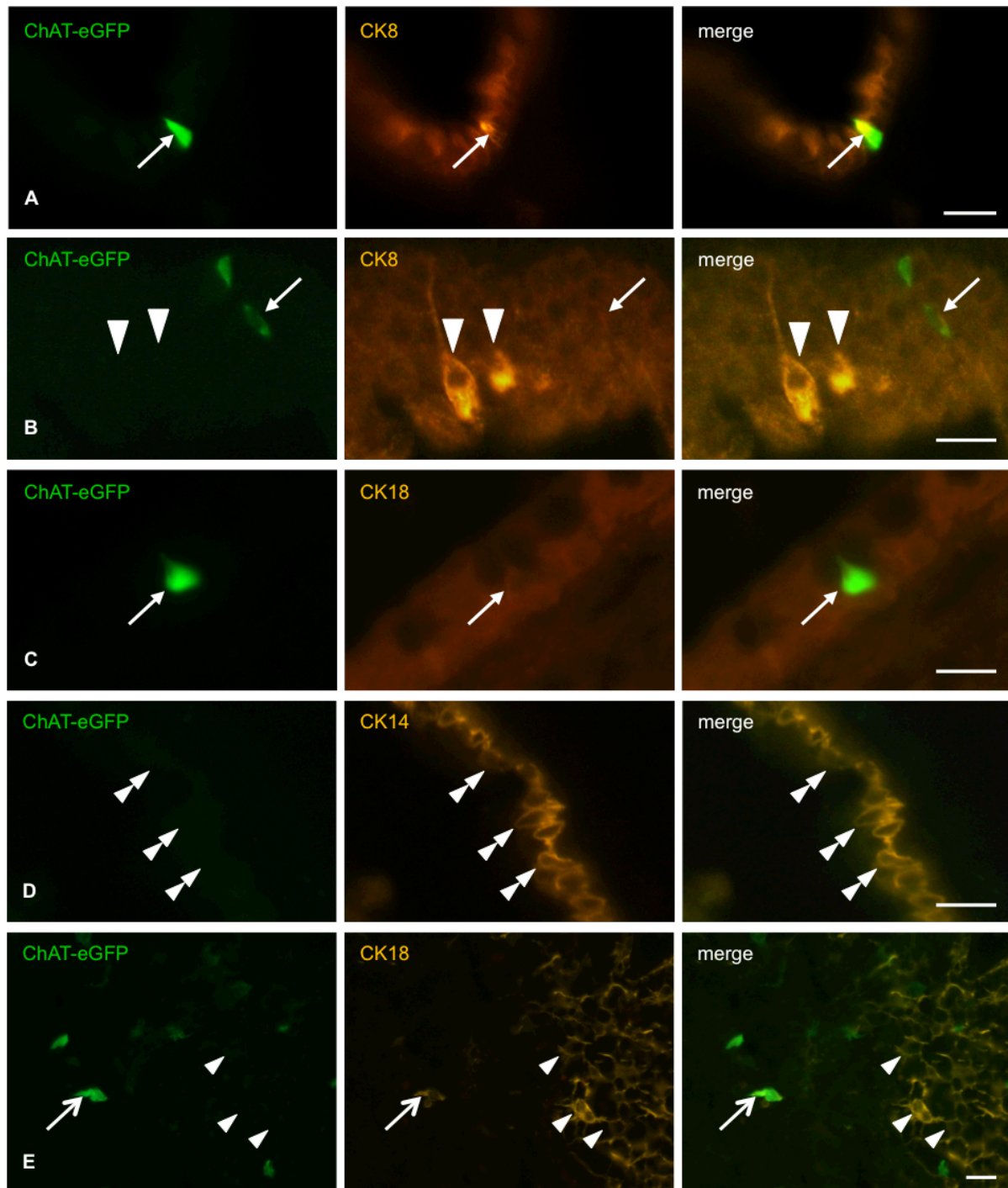


Abbildung 6: Immunhistochemie der Konjunktiva (A-D) und des Thymus (E) mit Antikörpern gegen Zytokeratine. **A** Schlanke, spindelförmige ChAT-eGFP- und CK8-positive Zelle im fornikalen Abschnitt des Epithels der Mausekonjunktiva (Pfeil). **B** CK8-positive, ChAT-eGFP-negative Zellen im Epithel der Mausekonjunktiva (Pfeilköpfe); daneben eine ChAT-eGFP-positive, CK8-negative Zelle (Pfeil). **C** Schlanke, spindelförmige ChAT-eGFP-positive und CK18-negative Epithelzelle der Konjunktiva (Pfeil). **D** CK14 im Epithel der Konjunktiva (Doppelpfeilköpfe). **E** ChAT-eGFP- und CK18-positive Zelle im Thymusmark (Pfeil), CK18-immunreaktive Zellen in der Thymusrinde (Pfeilköpfe); Balken: 20 µm

3.4 Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade in der Konjunktiva der Maus

3.4.1 ChAT-positive Epithelzellen

Schlanke, spindel- oder birnenförmige ChAT-positive Zellen mit apikalem und/oder basalem Fortsatz waren immunreaktiv für Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade. Die G-Protein-Untereinheit α -Gustducin wurde nur in wenigen dieser Zellen nachgewiesen (Abbildungen 7a und 7b). Die meisten der schlanken, spindelförmigen ChAT-positiven Zellen waren immunreaktiv für PLC β 2 und TRPM5 (Abbildungen 7c und 7d).

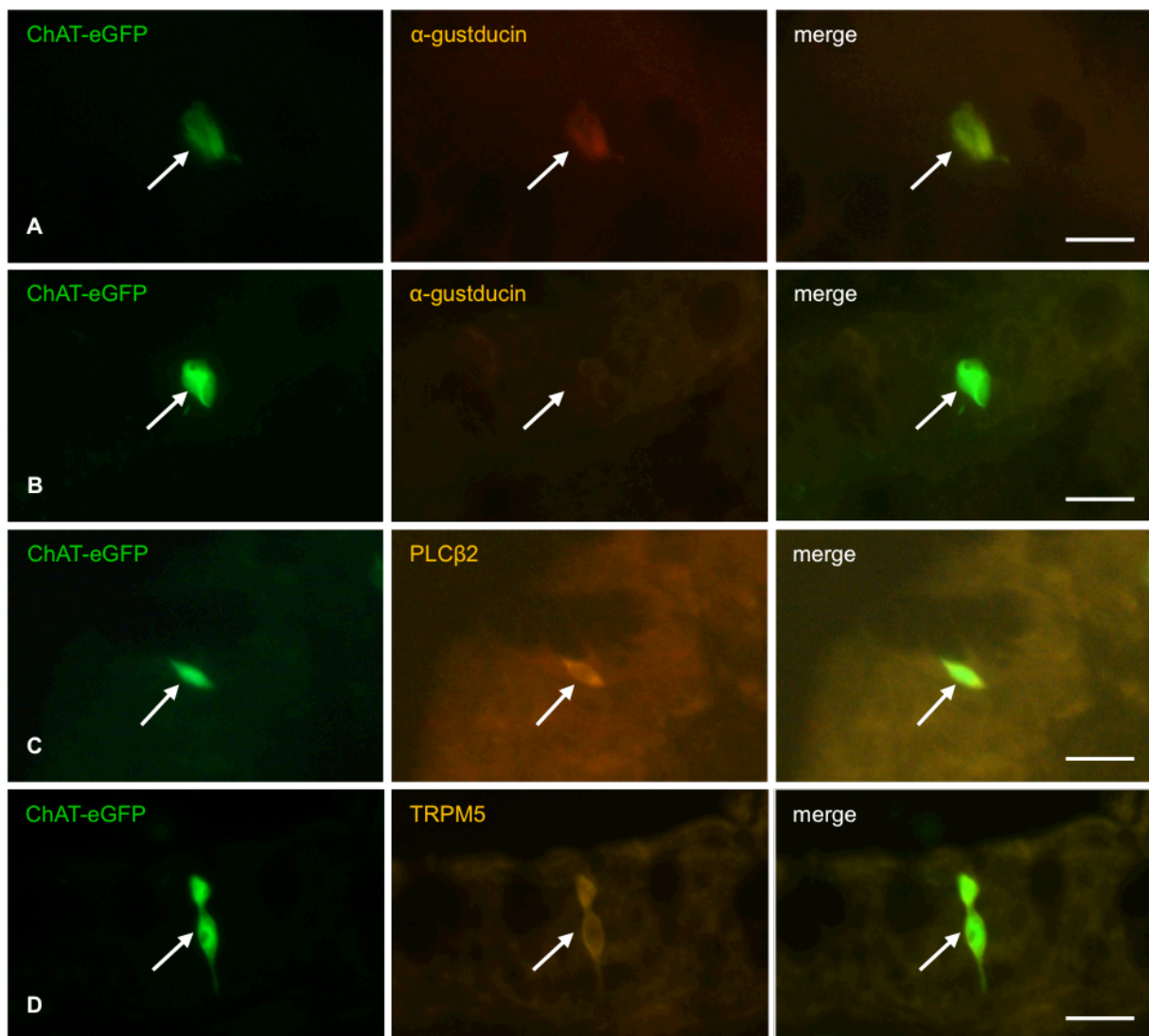


Abbildung 7: Immunhistochemie der ChAT-eGFP-positiven konjunktivalen Epithelzellen mit Antikörpern gegen chemosensorische Zellmarker; schlanke, spindelförmige ChAT-positive Zellen im fornikalen Anteil der Mausekonjunktiva (Pfeile) sind immunreaktiv für Bestandteile der

Geschmackstransduktionskaskade. **A** ChAT- und α -Gustducin-positive Zelle. **B** ChAT-positive, α -Gustducin-negative Zelle. **C** ChAT- und PLC β 2-positive Zelle. **D** ChAT- und TRPM5-positive Zelle; Balken: 20 μ m

3.4.2 Zellen des CALT

Auch im CALT konnte α -Gustducin in kleinen rundlichen Zellen nachgewiesen werden. Diese Zellen waren ChAT-negativ (Abbildung 8a). TRPM5-immunreaktive Zellen waren nicht nachweisbar (Abbildung 8b).

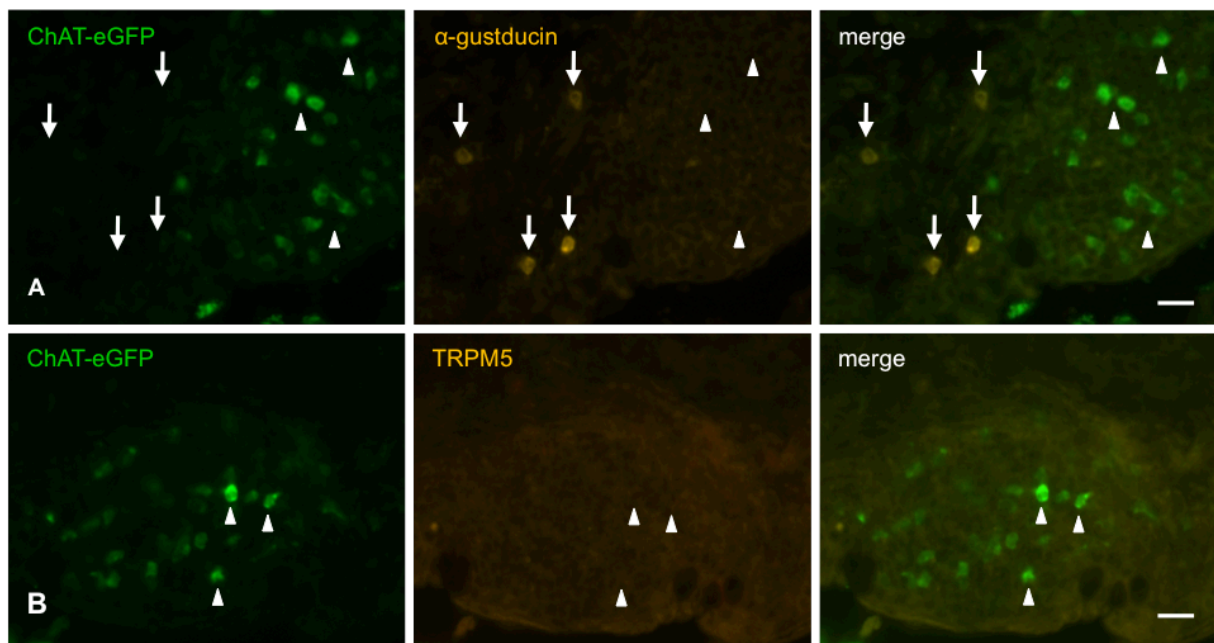


Abbildung 8: Immunhistochemie der ChAT-eGFP-positiven Zellen des CALT mit chemosensorischen Zellmarkern; Zellen des CALT sind α -Gustducin-positiv. **A** α -Gustducin-positive Zellen (Pfeile) und ChAT-positive Zellen (Pfeilköpfe). **B** TRPM5 konnte nicht nachgewiesen werden; Balken: 20 μ m

3.5 Nervenfasern im Augenlid der Maus

3.5.1 Peptiderge und chrna3-positive Nervenfasern in der Konjunktivalschleimhaut

In der Mauskonjunktiva konnten CGRP-immunreaktive Nervenfasern nachgewiesen werden (Abbildung 9). Diese Fasern zogen zum Teil weit in das Epithel hinein und erreichten fast die Oberfläche des Epithels (Abbildung 9b). Nervenfasern mit SP-Immunreaktivität zogen ebenfalls weit in das Epithel hinein (Abbildung 9c).

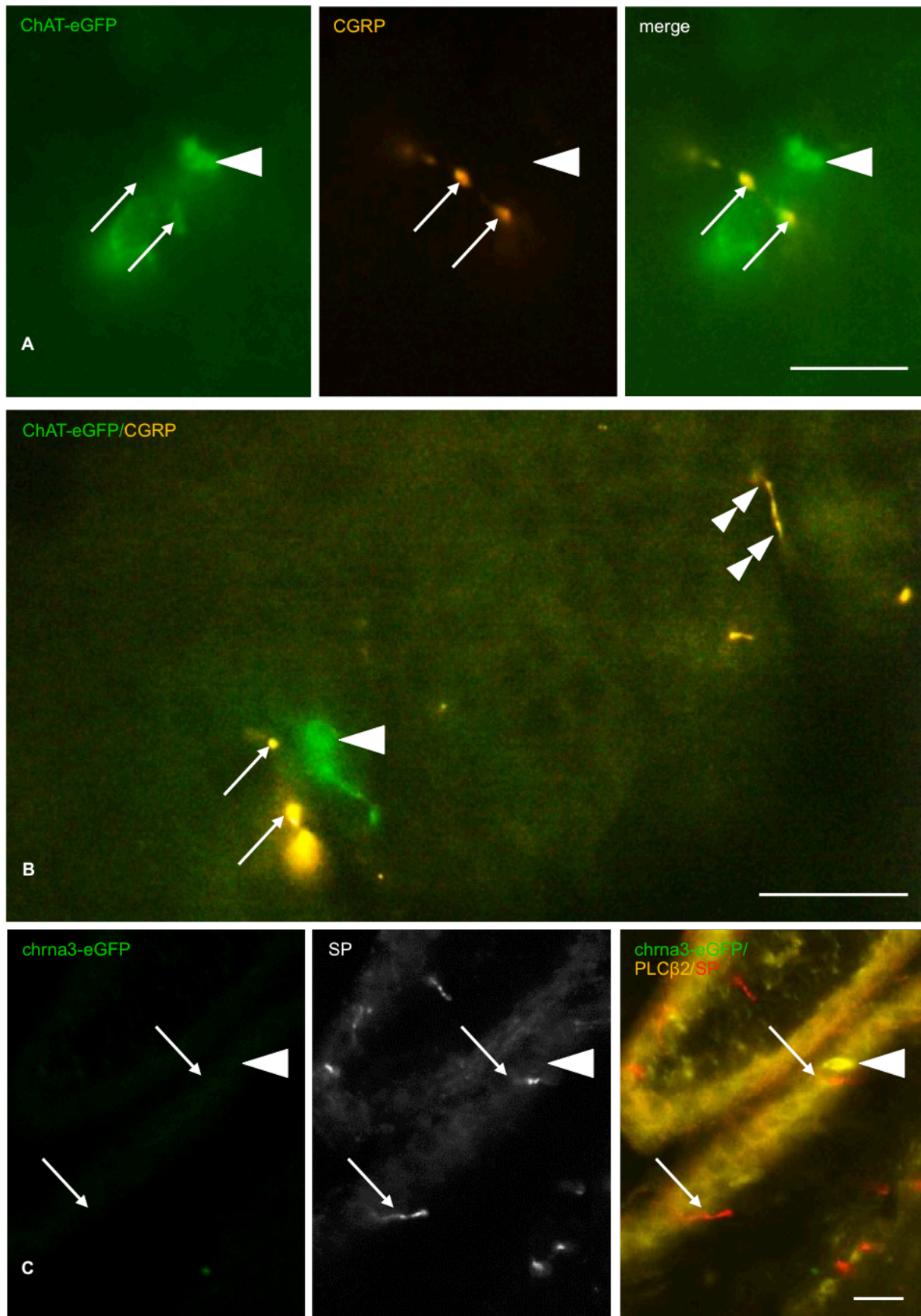


Abbildung 9: Immunhistochemie des Epithels der Konjunktiva mit Markern für peptiderge Neurone an ChAT-eGFP-Mäusen (A, B) und chrna3-eGFP-Mäusen (C). Bei chrna3-eGFP-Mäusen wurden mit einem

Antikörper gegen PLC β 2 die Zellen markiert, die Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade exprimieren (C). Die SP-Markierung in Abbildung C wurde mit dem Fluorophor Cy5 gekoppelt. Dieses leuchtet infrarot und erscheint auf dem schwarzweiß-Bild hell. Zur besseren Unterscheidung wurde diesem Signal bei der gleichzeitigen Darstellung aller Signale die Farbe rot zugewiesen. Nervenfasern (Pfeile, Doppelpfeilköpfe) dringen in das Epithel der Mauskonjunktiva ein. **A, B** CGRP-positive Fasern (Pfeile) kontaktieren schlanke, spindelförmige ChAT-positive Zellen (Pfeilköpfe). **C** SP-positive Fasern (Pfeile) befinden sich in der Nähe von PLC β 2-positiven Zellen (Pfeilköpfe); Balken A: 10 μ m, Balken B, C: 20 μ m

Dagegen konnten chrna3-positive Nervenfasern nicht im Epithel beobachtet werden. Alle drei Fasertypen waren subepithelial vorhanden und bildeten dort zum Teil dichte Nervenbündel (Abbildung 10).

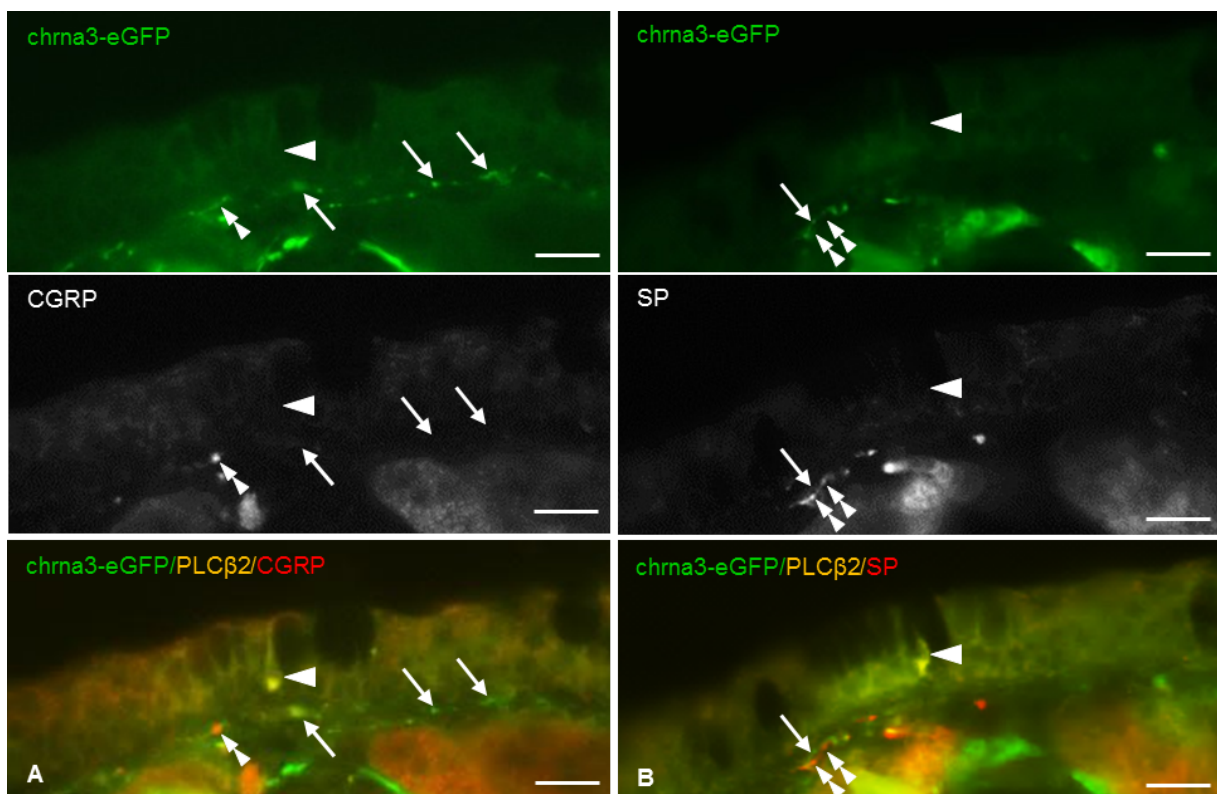


Abbildung 10: Immunhistochemie des Epithels der Konjunktiva mit Antikörpern gegen CGRP und SP an chrna3-eGFP-Mäusen. Die CGRP-Markierung in Abbildung A und die SP-Markierung in Abbildung B wurden mit dem Fluorophor Cy5 gekoppelt. Dieses leuchtet infrarot und erscheint auf den Schwarzweiß-Bildern hell. Zur besseren Unterscheidung wurde diesem Signal bei der gleichzeitigen Darstellung aller Signale die Farbe rot zugewiesen. Nicht alle PLC β 2-positiven Zellen (Pfeilköpfe) werden von Nervenfasern kontaktiert. **A** CGRP-positive- (Doppelpfeilköpfe) und chrna3-positive-Nervenfasern (Pfeile) befinden sich unterhalb des Epithels. **B** SP-positive (Doppelpfeilköpfe) und chrna3-positive Nervenfasern (Pfeile) befinden sich unterhalb des Epithels; Balken: 20 μ m

Auch ChAT-eGFP-positive Nervenfasern konnten intraepithelial nicht beobachtet werden. In den Meibom-Drüsen des Augenlids dagegen waren cholinerge und cholinozeptive Nervenfasern nachweisbar (Abbildung 11).

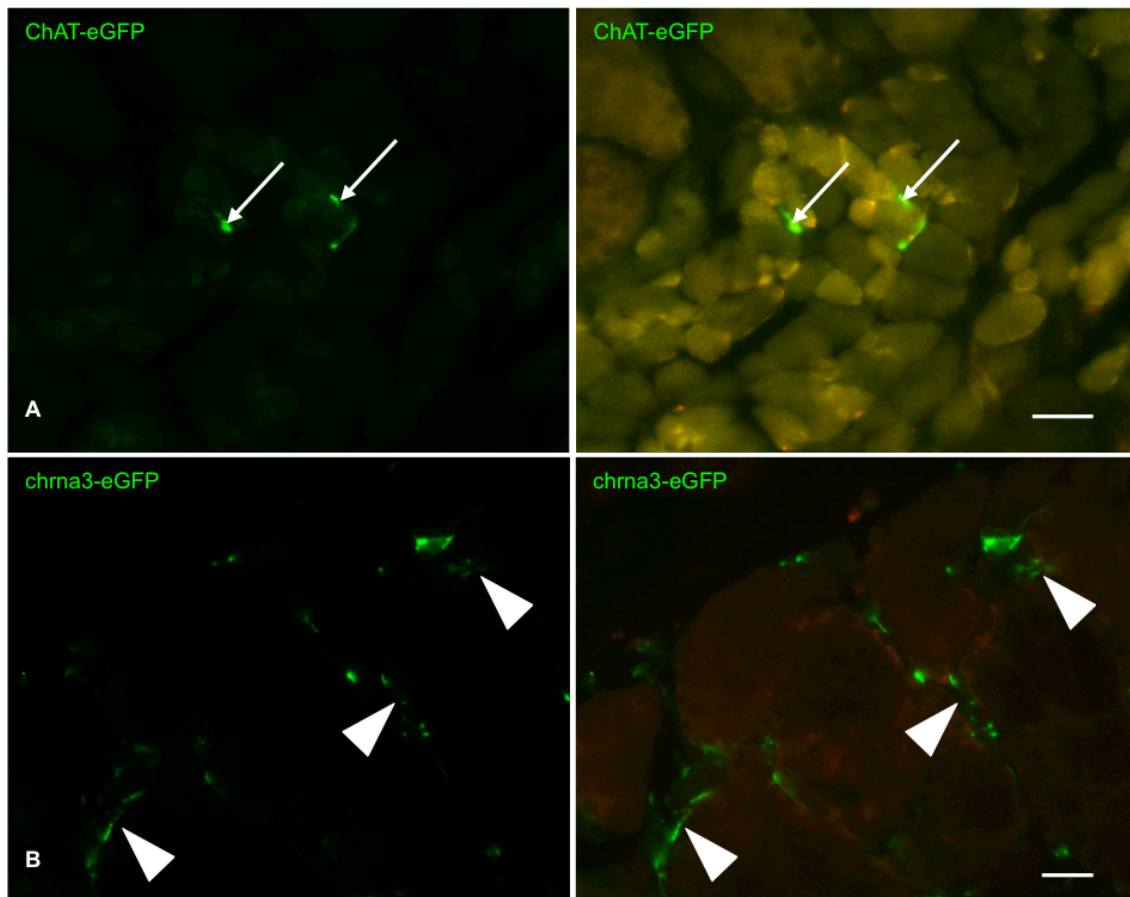


Abbildung 11: Parasympathische Nervenfasern innervieren die Meibom-Drüsen des Augenlids der Maus; zur besseren Darstellung des Hintergrundes wurden zusätzlich die Fluoreszenzfilterkombinationen für Cy3 verwendet. **A** ChAT-eGFP-positive Nervenfasern (Pfeile) befinden sich in den Meibom-Drüsen der ChAT-eGFP-Maus. **B** Viele chrna3-eGFP-positive Nervenfasern (Pfeilköpfe) durchziehen die Meibom-Drüsen der chrna3-eGFP-Maus; Balken: 20 µm

Auch die Skelettmuskulatur der ChAT-eGFP-Maus wurde durch zahlreiche ChAT-eGFP-positive Axone innerviert (Abbildung 12).

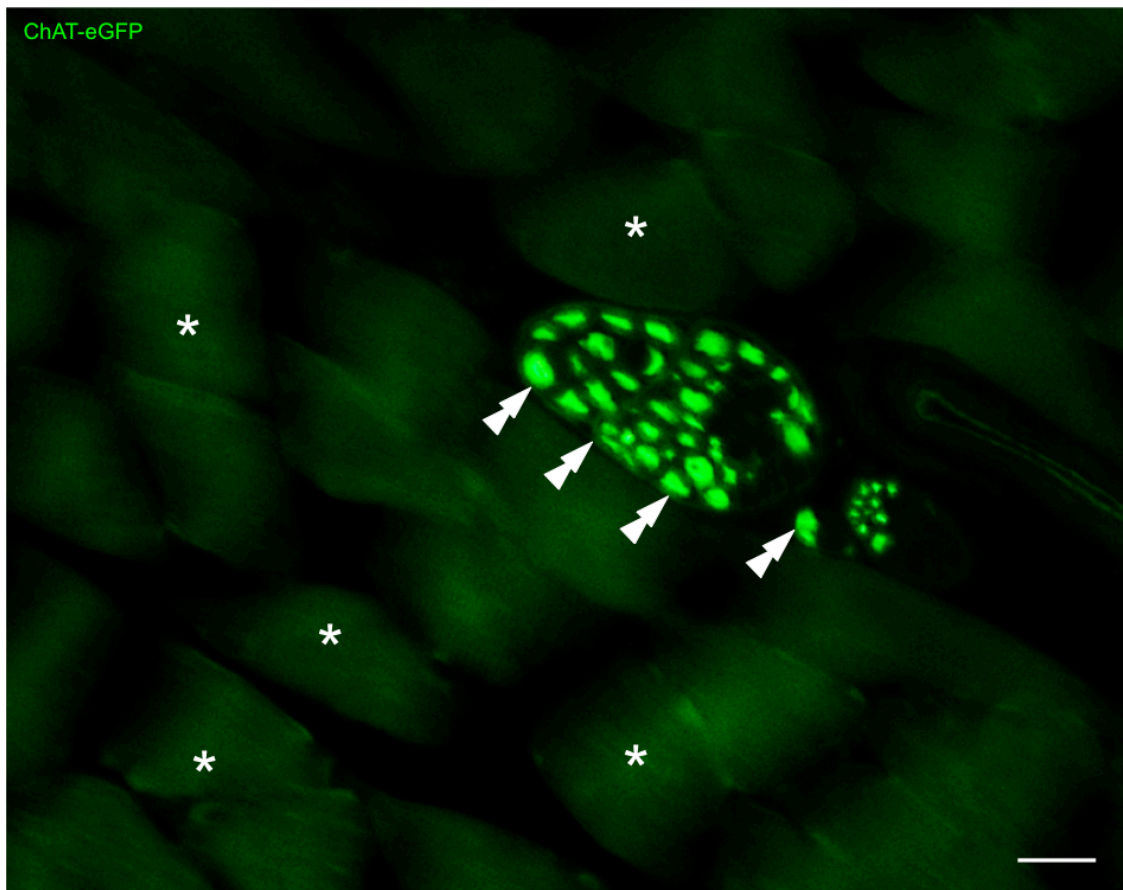


Abbildung 12: Nervenfaserbündel mit ChAT-eGFP-positiven Axonen (Doppelpfeilköpfe) in der Skelettmuskulatur (Sternchen markieren Skelettmuskelfasern) außerhalb des Augenlides der ChAT-eGFP-Maus; Balken: 20 μ m

3.5.2 Lagebeziehung der Nervenfasern zu cholinergen Epithelzellen

CGRP-positive Fasern kamen in engen Kontakt mit den schlanken ChAT-positiven Zellen (Abbildung 9a) oder verliefen in unmittelbarer Nachbarschaft zu diesen (Abbildung 9b). Nervenfasern, die immunreaktiv für SP waren, wurden ebenfalls in der Nähe der schlanken, ChAT-eGFP-positiven Zellen, die Moleküle der Geschmackstransduktionskaskade exprimieren, gefunden (Abbildung 9c). Obwohl viele dieser Zellen von Nervenfasern kontaktiert wurden, gab es auch solche, in deren unmittelbarer Umgebung keine Nervenfasern verliefen. In diesen Fällen war subepithelial ein Nervenfasergeflecht zu finden, das Fasern enthielt, die *chrna3*-eGFP-Expression zeigten, Fasern, die immunreaktiv für CGRP waren, und SP-positive Nervenfasern (Abbildung 10). Cholinerge Nervenfasern konnten nicht in der Umgebung ChAT-eGFP-positiver Zellen beobachtet werden und rundliche ChAT-positive Zellen wurden nicht von Nervenfasern kontaktiert.

4 Diskussion

Die konjunktivale CCC ist ein bisher unbekannter Zelltyp im Epithel der Konjunktiva

Die Ergebnisse zeigen eine bisher unbekannte Zelle mit cholinergen Eigenschaften und der molekularen Ausstattung zur Chemosensorik im Epithel der Konjunktiva. Morphologisch weist sie starke Ähnlichkeiten zu den spezialisierten cholinergen chemosensorischen Zellen der Atemwege, des Gastrointestinaltrakts, der Urethra und des Thymus auf (Höfer und Drenckhahn, 1996, Finger et al., 2003, Tizzano et al., 2009, Krasteva et al., 2011, Eberle et al., 2013, Deckmann et al., 2014). Analog zu den kürzlich beschriebenen cholinergen chemosensorischen Zellen des Thymus (thymic cholinergic chemosensory cell; thymic CCC) (Panneck et al., 2014) wurde deshalb der Name „konjunktivale CCC“ für diese Zelle gewählt. Die Bürstenzellen der Atemwege sind sowohl bei der Maus (Taira und Shibasaki, 1978, Krasteva et al., 2011, Tizzano et al., 2011) als auch bei der Ratte (Rhodin und Dalhamn, 1956, Merigo et al., 2005) und beim Menschen (Rhodin, 1966, DiMaio et al., 1990) vorhanden. Auch urethrale Bürstenzellen sind bei diesen Spezies vorhanden und konnten von Deckmann et al. in allen weiteren von ihnen untersuchten höheren Säugetieren gefunden werden. Darunter waren Vertreter von fünf unterschiedlichen Ordnungen (Primaten, Raubtiere, Unpaarhufer, Paarhufer, Nagetiere) (Deckmann et al., 2015). Das Vorhandensein von konjunktivalen CCC in anderen Spezies wurde noch nicht überprüft. Die Wahrscheinlichkeit, dass auch konjunktivale CCC bei anderen Spezies vorhanden sind, ist groß.

Die konjunktivale CCC besitzt die molekulare Ausstattung zur Chemosensorik

Eine Gemeinsamkeit dieser Zellen ist die Expression von Bestandteilen der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade, wie α -Gustducin, PLC β 2 und TRPM5 (Höfer und Drenckhahn, 1996, Finger et al., 2003, Tizzano et al., 2009, Krasteva et al., 2011, Eberle et al., 2013, Deckmann et al., 2014). Die G-Proteinrezeptoruntereinheit α -Gustducin wurde allerdings nur bei einem Teil der konjunktivalen CCC nachgewiesen. Neben α -Gustducin wurden auch andere α -Untereinheiten für G-Proteine von Geschmacksrezeptoren beschrieben, wie $G\alpha_{i-2}$, $G\alpha_{i-3}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$, $G\alpha_q$, $G\alpha_s$ und α -

Transducin (McLaughlin et al., 1992, McLaughlin et al., 1993, Ruiz-Avila et al., 1995, Kusakabe et al., 1998, Margolskee, 2002). Da α -Gustducin-knockout-Mäuse auch ohne α -Gustducin – wenn auch vermindert – auf bittere und süße Substanzen reagieren, scheinen auch andere α -Untereinheiten am Aufbau der G-proteingekoppelten Geschmacksrezeptoren beteiligt zu sein (Wong et al., 1996). Bei der konjunktivalen CCC könnte also α -Gustducin nur eine von mehreren α -Untereinheiten sein. Um welche und wie viele verschiedene α -Untereinheiten es sich handelt, muss noch ermittelt werden.

CK8 ist als Markermolekül für die konjunktivale CCC nur bedingt einsetzbar

Bestimmte CK-Isoformen wurden in chemosensorischen Zellen identifiziert und als Markermoleküle zur Abgrenzung gegen benachbarte Epithelzellen verwendet. Konjunktivale CCC sind CK8-immunreaktiv. Ähnlich wie im Thymus (Panneck et al., 2014) ist dieses CK allerdings nicht auf die CCC beschränkt, sondern markiert auch eine weitere Zellpopulation. CK18 wurde in gastrointestinalen Bürstenzellen und alveolären Bürstenzellen der Ratte gefunden (Kasper et al., 1994, Höfer und Drenckhahn, 1996), in mikrovillären Zellen vom Typ I des olfaktorischen Epithels (Asan und Drenckhahn, 2005) und in CCC sowie anderen epithelialen Zellen des Thymus (Höfer et al., 2000, Panneck et al., 2014). Allerdings wurde es weder in den chemosensorischen Zellen des Vomeronasalorgans der Ratte, noch, nach den vorliegenden Daten, in konjunktivalen CCC der Maus nachgewiesen. Dementsprechend können diese Marker nur unter bestimmten Umständen zur Identifizierung von chemosensorischen Zellen dienen und scheinen nicht zwangsläufig mit den chemosensorischen Eigenschaften von Zellen zusammen zu hängen.

Konjunktivale CCC haben die Voraussetzungen, um als Wächterzellen des Auges zu dienen

Die ersten Untersuchungen zur Funktion dieses Zelltyps wurden am Respirationstrakt durchgeführt. Diese chemosensorischen Zellen nehmen potenziell gefährliche Substanzen, zum Beispiel bakterielle Produkte, wahr, indem sie die Geschmackssensationen bitter und umami mithilfe der kanonischen

Geschmackstransduktionskaskade detektieren (Ogura et al., 2010, Krasteva et al., 2011, Tizzano et al., 2011, Saunders et al., 2014). Nach Stimulation schütten diese Zellen ACh aus, das wiederum sensorische Nervenfasern stimuliert und Atemreflexe (Krasteva et al., 2011, Tizzano et al., 2011) oder lokale Entzündungsreaktionen (Ogura et al., 2010, Saunders et al., 2014) auslöst. Ein ähnliches System wurde auch in der Urethra identifiziert. Dort fungieren cholinerge chemosensorische Zellen als polymodale Sensoren. Sie reagieren auf umami und bittere Substanzen sowie hitze-inaktivierte uropathogene *Escherichia coli*, setzen ACh frei und triggern die Miktion (Deckmann et al., 2014). Die Effekte in den Atemwegen und der Urethra werden als protektive Reflexe interpretiert, die das tiefere Eindringen von potenziellen Pathogenen verhindern (Atemreflexe), lokale Abwehrreaktionen einleiten (lokale Entzündungsreaktionen) und mögliche Erreger aus dem Körper befördern (Miktion) (Tizzano et al., 2009, Ogura et al., 2010, Krasteva et al., 2011, Deckmann et al., 2014, Saunders et al., 2014). Das Epithel der Konjunktiva wird ebenso von Krankheitserregern bedroht und benötigt ein effizientes System zur Pathogenerkennung und Pathogenabwehr. Die Konjunktivitis ist eine Erkrankung der Bindehaut, die am häufigsten von Viren hervorgerufen wird (Azari und Barney, 2013). Bakterielle Infektionen sind die zweithäufigste Ursache (Azari und Barney, 2013). Im Jahre 2005 erkrankten in den USA etwa 4 Millionen Einwohner an einer bakterielle Konjunktivitis, davon waren 65-78% Kinder. Konjunktivitiden verlaufen meist ohne größere Komplikationen, die oben genannten Fälle verursachten im Jahr 2005 dennoch Behandlungskosten von etwa 600 Millionen Dollar (Gigliotti et al., 1981, Weiss et al., 1993, Smith und Waycaster, 2009, Messmer, 2012). Die Entzündung der Kornea, Keratitis, ist seltener. Komplikationen einer Keratitis sind Ulzerationen der Kornea, die zum Verlust der Sehkraft führen können. Sie tritt häufig bei Kontaktlinsenträgern auf und wird meist durch das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ausgelöst (Pachigolla et al., 2007, Hazlett et al., 2014). Sowohl in der Nase als auch in der Trachea löste 3-Oxo-C12-Homoserinlacton, ein quorum sensing Molekül von *Pseudomonas aeruginosa*, protektive Reflexe aus (Tizzano et al., 2009, Krasteva et al., 2012a). Als quorum sensing wird die Fähigkeit von Bakterien bezeichnet, über Signalmoleküle (quorum sensing Moleküle) zu kommunizieren. Durch quorum sensing können sich Bakterien zu Biofilmen formieren und gegen Angriffe besser verteidigen (Venturi und Subramoni, 2009). Basierend auf den funktionellen Daten der Atemwegsschleimhaut und der urethralen Schleimhaut und der molekularen Ausstattung der konjunktivalen CCC ist es sehr wahrscheinlich, dass diese neu

entdeckten Zellen zur Erkennung und Elimination von Pathogenen beitragen. Funktionelle Studien sollten durchgeführt werden, um Klarheit zu bringen.

Konjunktivale CCC könnten lokale Effekte über parakrine Signalgebung vermitteln

Da es sich bei den konjunktivalen CCC um cholinerge Zellen handelt, ist die Signalübertragung mittels ACh, ebenso wie in Trachea und Urethra, sehr wahrscheinlich. Es könnte sich dabei um einen parakrinen Effekt handeln. ACh löst bei konjunktivalen Becherzellen die Sekretion von Schleim aus, was ein wichtiger Faktor zur Pathogenbeseitigung ist (Tseng et al., 1987, Hodges et al., 2012, Contreras-Ruiz et al., 2013). Die Stimulation der Becherzellen könnte also einer der protektiven Mechanismen durch ACh-Sekretion durch konjunktivale CCC sein. Allerdings wurden in keinem der beiden charakterisierten Systemen (Atemwege und Urethra) parakrine Effekte ohne Beteiligung von Nervenfasern untersucht, sondern nur Effekte unter Beteiligung sensorischer Nervenfasern (Krasteva et al., 2011, Deckmann et al., 2014). In der Mukosa der Nase und an der Öffnung des Vomeronasalorgans in die Nasenhöhle lösen Bitterstoffe über cholinerge Stimulation die Neuropeptidausschüttung aus sensorischen Nervenendigungen aus. Konsekutiv entsteht eine neurogene Entzündung mit Plasmaextravasion und lokaler Schwellung (Ogura et al., 2010, Saunders et al., 2014). Die strukturellen Voraussetzungen dafür bestehen auch in der fornikalen Konjunktiva, da peptiderge Nervenfasern sowohl in unmittelbarer Nähe von CCC vorhanden sind, als auch in Epithelregionen, die frei von CCC sind. Nach Schädigung der sensorischen Fasern durch Elektrokoagulation des Nervus maxillaris und Nervus ophthalmicus bei Ratten wurde ein Großteil dieser Nervenfasern abgebaut, während eine Sympathektomie durch Entfernung des Ganglion cervicale superius keinen Effekt zeigte (Luhtala und Uusitalo, 1991). Retrogrades Tracing von Neuronen bei Ratten bestätigte, dass diese Fasern sensorisch sind und von Zellkörpern des Ganglion trigeminale stammen (Elsas et al., 1994).

Chrna3-positive Fasern bleiben subepithelial, aber chrna3-negative cholinerge Fasern könnten im Epithel der Konjunktiva vorhanden sein

Der Ursprung der subepithelialen chrna3-positiven Fasern muss noch ermittelt werden. Präganglionäre Nervenfasern des autonomen Nervensystems setzen ACh zur Aktivierung der postganglionären Nervenfasern frei. Die schnelle synaptische Signalübertragung wird dort durch nAChRs vermittelt. Das bedeutet, dass alle autonomen postganglionären Neurone nAChRs besitzen (Skok, 2002, Vernino et al., 2009). Neuronale nAChRs bestehen, wie alle nAChRs, aus fünf Untereinheiten, von denen mindestens zwei α -Untereinheiten sind. Obwohl in autonomen Ganglien viele verschiedene nAChR-Untereinheiten gefunden wurden ($\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ und $\beta 4$), scheint die nAChR-Untereinheit $\alpha 3$ die zentrale Rolle zu spielen (Wada et al., 1989, Boulter et al., 1990, Deneris et al., 1991, Skok et al., 1999, Skok, 2002, Wang et al., 2002, Vernino et al., 2009). Knockout-Mäuse, denen die nAChR-Untereinheit $\alpha 3$ fehlt, haben eine vergrößerte Blase, Mydriasis und weisen große Defizite des autonomen Nervensystems auf (Xu et al., 1999). Das eGFP-Gen in den von uns verwendeten chrna3(Bac)-eGFP-Mäusen ist an das chrna3-Gen in einer Form gekoppelt, bei der eGFP in jeder Zelle entsteht, in der der Promoter für die nAChR-Untereinheit $\alpha 3$ aktiv ist. Das eGFP ist aber nicht an die nAChR-Untereinheit $\alpha 3$ gebunden, sondern liegt frei im Zytoplasma vor (Frahm et al., 2011). Von der Lokalisation des eGFP-Signals kann also nicht auf die Lokalisation der nAChR-Untereinheit $\alpha 3$ in der Zelle geschlossen werden. Die subepithelialen chrna3-positiven Nervenfaserteile könnten also gar nicht das Protein der nAChR-Untereinheit $\alpha 3$ tragen, sondern Teil eines Neurons sein, das diese an anderer Stelle besitzt. Dazu gehören alle postganglionären sympathischen und parasympathischen Neurone.

Auch sensorische Fasern können nAChRs besitzen. Im Spinalganglion und im Ganglion inferius des Nervus vagus der Ratte wurden nAChRs nachgewiesen (Genzen et al., 2001, Khan et al., 2003, Haberberger et al., 2004, Mao et al., 2006). Die häufigste nAChR-Untereinheit war dort $\alpha 3$ (Mao et al., 2006). Krasteva et al. konnten 2011 zeigen, dass cholinerge sensorische Neurone aus vagalen Ganglien mit der nAChR-Untereinheit $\alpha 3$ tracheale Bürstenzellen kontaktieren. Nach intratrachealer Gabe von Bitterstoffen vermitteln diese Nervenfasern respiratorische Reflexe über die Aktivierung der neuronalen nAChRs durch ACh (Krasteva et al., 2011). Auch die viszerosensorischen Neurone des Urogenitaltraktes besitzen hauptsächlich die nAChR-

Untereinheit $\alpha 3$ (Nandigama et al., 2013). Deckmann et al. wiesen 2014 nach, dass urethrale Bürstenzellen ebenso von cholinozeptiven sensorischen Neuronen kontaktiert werden und Miktionsreflexe nach intraurethraler Applikation von Bitterstoffen vermitteln (Deckmann et al., 2014). Im Epithel der Konjunktiva konnte kein Kontakt zwischen konjunktivalen CCC und cholinozeptiven Nervenfasern mit der nAChR-Untereinheit $\alpha 3$ nachgewiesen werden. Auch ein Eindringen dieser cholinozeptiven Nervenfasern in das Epithel konnte nicht beobachtet werden. Allerdings wurde aufgrund der vorherigen Studien mit cholinergen chemosensorischen Epithelzellen in anderen Regionen des Körpers ausschließlich nach Fasern gesucht, die die nAChR-Untereinheit $\alpha 3$ besitzen. Diese nAChR-Untereinheit ist zwar in sensorischen Nervenfasern der Atemwege und des Urogenitaltrakts die häufigste nAChR-Untereinheit, ob dies aber auch für das Auge gilt, ist unklar. Im Ganglion trigeminale der Ratte und im Spinalganglion des Huhns wurde mRNA für die nAChR-Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 5$ gefunden (Wada et al., 1989, Wada et al., 1990, Boyd et al., 1991, Flores et al., 1996). Konjunktivale CCC könnten also durch cholinozeptive sensorische Fasern kontaktiert werden, deren nAChRs aus anderen α -Untereinheiten besteht.

Intraepitheliale peptiderge Nervenfasern könnten Becherzellen stimulieren oder eine neurogene Entzündung triggern

Epitheliale CGRP-immunreaktive Nervenfasern kontaktieren Becherzellen in der Ratte nicht spezifisch, aber eine parakrine Aktivierung der Becherzellsekretion über die Aktivierung von sensorischen Nervenfasern wurde vorgeschlagen (Dartt et al., 1995). Mittels Autoradiographie wurden CGRP-Bindungsstellen in der limbalen Konjunktiva gezeigt. Durch die begrenzte räumliche Auflösung dieser Methode konnte allerdings nicht zwischen verschiedenen Zelltypen unterschieden werden (Heino et al., 1995). Eine Stimulation der Mukusproduktion der Becherzellen durch CGRP-immunreaktive Fasern ist möglich. Mantelli et al. halten es aber für wahrscheinlicher, dass diese Fasern eine neurogene Entzündung auslösen (Mantelli et al., 2010). CGRP ist ein starker Vasodilatator und kann dadurch die Blutzufuhr zu Organen oder Gewebeabschnitten regulieren (Fischer und Born, 1985, Tippins, 1986, Zaidi et al., 1987, Breimer et al., 1988, Preibisz, 1993, Wimalawansa, 1996). Durch Vasodilatation kann CGRP auch

eine Plasmaextravasation hervorrufen, ein wichtiger Bestandteil der neurogenen Entzündung (Streilein et al., 2000, Holzmann, 2013). Dies wurde auch für das Auge gezeigt (Heino et al., 1995, Mantelli et al., 2010). SP spielt ebenso wie CGRP eine zentrale Rolle bei der neurogenen Entzündung (Richardson und Vasko, 2002). In der Nase triggern SCC mittels cholinergischer Signalgebung zu peptidergen sensorischen Nervenfasern Mastzelldegranulation und Austritt von Blutplasma aus den Gefäßen (plasma leakage) als Antwort auf den Bitterstoff Denatonium und das *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing Molekül 3-Oxo-C12-Homoserinlaktone (Saunders et al., 2014). Konjunktivale CCC könnten ebenso über ihre Kontakte zu CGRP- und SP-immunreaktiven Fasern auf Stimulation eine neurogene Entzündung triggern.

Über Kontakte zu sensorischen Nervenfasern könnten konjunktivale CCC protektive Reflexe auslösen

Weitere protektive Reflexe sind der Lidschlussreflex und die Erhöhung des Tränenflusses. Studien weisen darauf hin, dass es verschiedene Arten des Lidschlussreflexes gibt. Bekannt ist, dass der Lidschluss direkt durch Stimulation von afferenten Fasern des Nervus trigeminus in der Kornea, die in die pontomedulläre Formatio reticularis ziehen, vermittelt werden kann (Ongerboer de Visser und Kuypers, 1978, Benbir und Kiziltan, 2014). Auch die Konjunktiva wird von sensorischen Fasern über den Nervus trigeminus innerviert (Duke-Elder, 1961). Die Ursprünge des somatosensorisch evozierten Lidschlussreflexes sind hingegen noch unklar. Es wird vermutet, dass sowohl taktile als auch auditorische und visuelle sensorische Modalitäten über einen gemeinsamen Weg den Lidschlussreflex auslösen können (Rimpel et al., 1982). Konjunktivale CCC könnten auch am Lidschlussreflex beteiligt sein. Die Sekretion der Tränenflüssigkeit ist wichtig, um die Kornea feucht zu halten, sie zu ernähren und um sie vor äußeren Einflüssen zu schützen (Dartt, 2009). Untersuchungen zeigten, dass die Produktion der wässrigen Tränenflüssigkeit durch die Tränendrüse (Ruskell, 1971, Dartt, 2009, Meng und Kurose, 2013) und auch die Produktion von Muzinen durch die Becherzellen parasympathisch gesteuert sind (Dartt et al., 1995, Kessler et al., 1995, Kanno et al., 2003, Dartt, 2004, Meng und Kurose, 2013). Unterbricht man diese Innervation, reduziert sich die Produktion der Tränenflüssigkeit und die Becherzellichte nimmt ab (Toshida et al., 2007, Meng und

Kurose, 2013). Yasui et al. konnten an Katzen zeigen, dass eine Stimulation trigeminaler Afferenzen zu einem Anstieg der Sekretion von wässriger Tränenflüssigkeit führt (Yasui et al., 1997). Kessler et al. zeigten einen Anstieg der Muzinproduktion nach Aktivierung trigeminaler Afferenzen bei Ratten (Kessler et al., 1995). Polymodale afferente Neurone der Kornea können mechanische, thermische und chemische Reize wahrnehmen (Chen et al., 1997, Belmonte et al., 2004, Belmonte und Gallar, 2011, Meng und Kurose, 2013). Sowohl Hitze als auch Kälte aktivieren diese Neurone (Belmonte et al., 2004, Belmonte und Gallar, 2011). Neben exogenen chemischen Reizen wurden auch endogene chemische Mediatoren erkannt, die durch verletztes Gewebe, entzündliche Prozesse, oder plasma leakage freigesetzt werden (Chen et al., 1997, Belmonte et al., 2004, Belmonte und Gallar, 2011). Eine Markierung von Nervenfasern mit Bestandteilen der Geschmackstransduktionskaskade in der Kornea oder der Konjunktiva konnten wir nicht feststellen. Bereits in anderen Organen wurde gezeigt, dass die Erkennung von Bitterstoffen mithilfe der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade protektive Reflexe auslöst (Finger et al., 2003, Krasteva et al., 2011, Deckmann et al., 2014). Die konjunktivale CCC könnte hier das fehlende Bindeglied darstellen.

Pharmakologische Effekte durch Cholinergika, Anticholinergika und Bitterstoffe an konjunktivalen CCC könnten therapeutisch genutzt werden

Welche Effekte durch die Aktivierung der CCC hervorgerufen werden, ist bisher nicht bekannt, kann aber von großer Relevanz für die Augenheilkunde sein. Pharmakologisch könnte man diese Zellen durch Bitterstoffe aktivieren und durch Anticholinergika ihre Effekte hemmen. Geht man davon aus, dass konjunktivale CCC über Reflexe einen gesteigerten Tränenfluss auslösen und die Frequenz des Lidschlusses steigern, so wäre dies ein wünschenswerter Effekt bei Patienten, die unter einer Keratokonjunktivitis sicca leiden. In Deutschland weist ein Viertel aller Patienten, die einen Augenarzt aufsuchen, Symptome einer Keratokonjunktivitis sicca auf (Brewitt und Sistani, 2001). Der Tränenfilm dieser Patienten ist vermindert. Dies führt zu schmerzhaften Irritationen der Kornea und kann in schweren Fällen Kornealäsionen oder Infektionen auslösen (Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop, 2007, Meng und Kurose, 2013). Ursprünglich ging man davon aus, dass

eine verminderte Produktion von Tränenflüssigkeit oder eine vergrößerte Verdunstungsrate der Tränenflüssigkeit, beispielsweise durch einen unvollständigen Lidschluss, alleinige Auslöser seien (Barabino und Dana, 2007, Latkany, 2008). Neuere Erkenntnisse zeigen aber, dass es sich um eine multifaktorielle Erkrankung handelt, die eine wichtige inflammatorische und immunologische Komponente hat (Barabino und Dana, 2007, Latkany, 2008). Geht man allerdings davon aus, dass die Aktivierung der konjunktivalen CCC auch zu einer neurogenen Entzündung führt, so würde eine pharmakologische Aktivierung die Erkrankung hingegen noch vorantreiben.

Da konjunktivale CCC cholinerg sind, stünden zur pharmakologischen Aktivierung oder Hemmung der Signalgebung bereits erprobte Medikamente zur lokalen Applikation zur Verfügung (Duncan und Collison, 2003). Das hat allerdings auch zur Folge, dass bei Gabe von Medikamenten, die auf das cholinerge System wirken, weitere Nebenwirkungen in Betracht gezogen werden müssen. Viele Nebenwirkungen sind bereits durch den klinischen Einsatz dieser Mittel bekannt (Shaffer und Hetherington, 1966, Duncan und Collison, 2003). Die Ursache mancher dieser Nebenwirkungen könnte einen Zusammenhang mit den konjunktivalen CCC haben. Geht man davon aus, dass cholinerge chemosensorische Zellen ein wichtiger Bestandteil der Infektabwehr mittels cholinergischer Signalgebung sind, so ergeben sich daraus auch mögliche Nebenwirkungen. Anticholinergika (lokal oder systemisch) können eine erfolgreiche Pathogenabwehr auf dieser Ebene vermindern oder gar ganz verhindern. Als Folge könnte die Gefahr für Infektionen des Auges erhöht sein. Dies sollte vor allem bei Risikogruppen berücksichtigt werden. Patienten nach einer Augenoperation erkranken häufiger an Augeninfektionen, die durch *Staphylococcus aureus* verursacht werden (Green, 2012, Abrishami et al., 2015). Keratokonjunktivitis sicca-Patienten, deren Korneae *Fusaria* und *Pseudomonas aeruginosa* oder andere Gram-negative Bakterien aufwiesen, hatten einen statistisch signifikant schlimmeren Krankheitsverlauf, als Patienten, deren Korneae diese Keime nicht aufwiesen (Green et al., 2008). Der Einsatz von Kontaktlinsen, intraokulären Linsen und Nahtmaterial bildet außerdem ideale Voraussetzungen zur Bildung eines bakteriellen Biofilms (Zegans et al., 2002, Yarwood et al., 2004, Nucci et al., 2005, Hou et al., 2012, Khalil und Sonbol, 2014). Dies ist ein neuer und wichtiger Faktor bezüglich Infektionen am Auge. Durch die Bildung von Biofilmen können Bakterien sich besser gegen körpereigene und pharmakologische Angriffe schützen (Zegans et al., 2002, Nucci et al., 2005, Szczotka-Flynn et al., 2009).

Auch verlieren immer größere Gruppen von Antibiotika für das Auge ihre Wirkung durch Resistenzbildung (Brown, 2007, Asbell et al., 2008, Adebayo et al., 2011, Sharma, 2011, Reinprayoon et al., 2015). Studien zeigen, dass in der amerikanischen Bevölkerung Infektionen des Auges durch Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) ansteigen (Cavuoto et al., 2008, Adebayo et al., 2011). Durch *Staphylococcus aureus* werden bis zu 30% aller nosokomialen Infektionen, vor allem auf Intensivstationen verursacht. Neben postoperativen Wundinfektionen sind vor allem Pneumonien und andere Infektionen des Respirationstraktes sowie Septikämien problematisch (Vincent et al., 1995, Spencer, 1996, Weber et al., 1999). Eine frühe Antwort zur Infektabwehr, wie sie für cholinerge chemorezeptive Zellen postuliert wird, wäre daher äußerst effektiv zur Verhinderung von Infektionen des Auges.

Es sollte auch geklärt werden, ob okulär applizierte Pharmaka bittere Komponenten enthalten, die eine ständige Stimulation der konjunktivalen CCC zur Folge haben. Mögliche Folgen könnten von vermehrtem Tränenfluss bis zu chronischen neurogenen Entzündungen des Auges reichen.

Aufgrund ihrer Lage im Fornix conjunctivae des medialen Augenwinkels können konjunktivale CCC die Tränenflüssigkeit überwachen

Konjunktivale CCC waren nicht über die gesamte Konjunktiva verteilt, sondern wurden lediglich im Fornix conjunctivae des medialen Augenwinkels der Maus gefunden. Auch die ableitenden Tränenwege der Maus waren frei von CCC. Geht man von einer Funktion als Wächterzelle aus, die die Tränenflüssigkeit auf bakterielle Eindringlinge überprüft, so wären die CCC in der Lage, einen großen Teil der Tränenflüssigkeit auf ihrem Weg in die ableitenden Tränenwege zu überprüfen. Das Volumen des Tränenfilms des menschlichen Auges kann Anhand von durchschnittlichen Werten für die Augenabmessungen berechnet werden (Bron et al., 2002, Tiffany, 2008). Das Volumen des Tränenfilms unter den Lidern beträgt etwa 5-6 µl. Die interpalpebrale Augenoberfläche enthält etwa 1,0 µl (Tiffany, 2008). Entlang der Lidkanten bilden sich sogenannte Tränenmenisken, deren errechnetes Volumen etwa 2,9 µl beträgt (Bron et al., 2002). Bei jedem Lidschluss werden die Tränenpünktchen aufeinander gedrückt. Wenn sich das Auge öffnet, entsteht ein Unterdruck in den Tränenkanälchen, der zum Einstrom der in den Augen befindlichen Tränenflüssigkeit führt (Lemp und Weiler,

1983). Durch ständige Produktion von Tränenflüssigkeit fließt neue Tränenflüssigkeit nach (Tiffany, 2008). Der größte Anteil der Tränenflüssigkeit befindet sich also unter den Lidern und ein Durchfluss von Tränenflüssigkeit durch das gesamte Auge erfolgt nach jedem Lidschluss. Schon bei einer geringen Menge an Bitterstoffen in der Tränenflüssigkeit ist eine Verteilung dieser Substanzen bis in den medialen Augenwinkel innerhalb kürzester Zeit zu erwarten. Geht man von einer parakrinen Aktivierung der Nachbarzellen durch die CCC aus, so ist die Lage der CCC in der Konjunktiva sinnvoller, als eine Lage in den ableitenden Tränenwegen. Die Lage der CCC in der Konjunktiva kann aber auch speziesspezifisch sein.

Auch Vorhandensein und Lage von CALT und EALT unterscheiden sich je nach Spezies. Während das EALT beim Menschen die Mukosa des Auges von der Tränendrüse über den medialen Kanthus bis in die ableitenden Tränenwege durchzieht (Knop et al., 2003), ist bei der Maus lediglich CALT vorhanden und weitgehend auf die Konjunktiva der Nickhaut begrenzt (Chodosh et al., 1998, Sakimoto et al., 2002, Steven et al., 2008). Nur eine Studie fand auch im Fornix conjunctivae der Maus Lymphfollikel, allerdings erst nach Antigenstimulation. In derselben Studie stieg nach Stimulation mit dem Antigen auch die Anzahl der Lymphfollikel in der Nickhaut an (Sakimoto et al., 2002). Die Abhängigkeit der Ausprägung des CALT von einer immunologischen Aktivierung fand sich auch bei weiteren Studien und kann ein Hinweis darauf sein, dass CALT bei der Maus nicht regulär vorhanden ist (Chodosh et al., 1998, Sakimoto et al., 2002, Steven et al., 2008).

ChAT-eGFP-immunreaktive Lymphozyten könnten im CALT vorhanden sein und mit anderen Zellen des NNCS des Auges interagieren

Wenn CALT im untersuchten Gewebe enthalten war, konnten in den Lymphfollikeln auch Zellpopulationen mit ChAT-eGFP-Immunreaktivität und andere Zellen mit α -Gustducin-Immunreaktivität nachgewiesen werden. Die Zellen, die ChAT exprimierten, waren klein und rundlich. Aufgrund ihrer Lokalisation und der Morphologie handelt es sich wahrscheinlich um Lymphozyten. Auch T-Lymphozyten sind Bestandteil des NNCS. Sie exprimieren ChAT und produzieren ACh (Fujii et al., 1996, Rinner et al., 1998, Kawashima und Fujii, 2000, Fujii und Kawashima, 2001, Kawashima und Fujii, 2003). Reardon et al. konnten 2013 nachweisen, dass auch B-Lymphozyten ChAT

exprimieren und ACh produzieren (Reardon et al., 2013). Sowohl B- als auch T-Lymphozyten besitzen muskarinische und nikotinische ACh-Rezeptoren (Sato et al., 1999, Kawashima und Fujii, 2000, 2003). Werden B- oder T-Lymphozyten in vitro aktiviert, so erfolgt eine Hochregulation der ACh-Synthese sowie der M₅-Isoform von mAChRs (Kawashima und Fujii, 2000). Kawashima et al. postulieren deshalb, dass bei einer immunologischen Stimulation der Lymphozyten in vivo die cholinerge Signalübertragung zu Zielzellen über diesen Mechanismus verstärkt wird (Kawashima und Fujii, 2003). Zielzellen könnten jegliche Zellen in der Umgebung der Lymphozyten mit ACh-Rezeptoren sein, wie zum Beispiel die Lymphozyten selbst, Makrophagen (Mikulski et al., 2010), oder auch cholinozeptive Nervenfasern, wie sie in dieser Studie auch in der Konjunktiva nachgewiesen wurden. Ein Zusammenwirken der einzelnen Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems des Auges ist sehr wahrscheinlich. Cholinerge Lymphozyten und CCC könnten über Aktivierung protektiver Reflexe, lokaler Abwehrmechanismen und Stimulation weiterer Immunzellen eine frühe Einheit zur Pathogenabwehr bilden.

Zellen mit α -Gustducin-Immunreaktivität im CALT könnten zu einer chemosensorischen Subpopulation von Leukozyten gehören

Auch die Zellen des CALT, die α -Gustducin exprimierten, waren klein und rundlich und könnten aufgrund ihrer Lokalisation und der Morphologie ebenfalls Lymphozyten sein. Die Expression von α -Gustducin in Zellen des Immunsystems wurde bisher noch nicht beschrieben. Malki et al. zeigten 2015 in Subpopulationen von Leukozyten aus menschlichem und bovinem Blut die Expression von GPCRs, die spezifisch für die Geruchs- und Geschmackswahrnehmung sind. Neben olfaktorischen Rezeptoren (odorant receptors, ORs) waren darunter auch Tas1Rs und Tas2Rs (Malki et al., 2015). Da α -Gustducin eine α -Untereinheit der G-Protein gekoppelten Geschmacksrezeptoren ist, könnte es sich bei den hier markierten Zellen um eine dieser Zellpopulationen handeln. Genauere Untersuchungen zur Bestimmung des α -Gustducin-exprimierenden Zelltyps und zur Koexpression mit den oben genannten Geschmacksrezeptoren stehen allerdings noch aus. Welche Funktion eine Subpopulation von chemosensorischen Immunzellen haben könnte, bleibt zur Zeit noch Spekulation. Malki et al. erwägen die Möglichkeit einer chemosensorischen Überwachung der Blutbahn vor allem im Bereich

des Gastrointestinaltraktes nach Nahrungsaufnahme. Hier sollen, als weitere Kontrollinstanz nach der gustatorischen Kontrolle im Mund, in die Blutbahn aufgenommene Bestandteile aus der Nahrung noch einmal auf ihre chemische Beschaffenheit untersucht werden (Malki et al., 2015). Allerdings wäre auch eine funktionelle Verwandtschaft mit den chemosensorischen Zellen der Schleimhäute denkbar. Ergänzend zu den bereits bekannten Mechanismen des Immunsystems könnten sie helfen, infektiöse Herde oder bakterielle Toxine innerhalb des Körpers zu detektieren.

Haarschaftzellen exprimieren ChAT

Die Untersuchung der Haut und Hautanhangsgebilde war nicht Ziel dieser Studie. Allerdings fiel eine starke eGFP-Fluoreszenz von Haarschaftzellen im Bereich des Isthmus der Haare von ChAT-eGFP-Mäusen auf. Der Haarschaft wird von epithelialen Zellen umgeben, die sich in eine innere und eine äußere Wurzelscheide differenzieren lassen. Während die äußere Wurzelscheide in die Basalschicht der Epidermis übergeht und ein permanenter Strukturanteil des Haarfollikels ist, löst sich die innere Wurzelscheide in Höhe des Infundibulums auf und ist ausschließlich in der Wachstumsphase vorhanden (Paus und Cotsarelis, 1999, Al-Nuaimi et al., 2010). Obwohl bisher wenige Studien dazu veröffentlicht wurden, gibt es bereits Hinweise darauf, dass auch Bestandteile der Haarfollikel Teil des NNCS sind. Haberberger et al. beschrieben 2002, dass in der inneren Wurzelscheide der hoch-affine Cholintransporter CHT1 exprimiert wird (Haberberger et al., 2002). Kurzen et al. berichteten 2004 erstmals über das Vorhandensein von nAChRs und mAChRs in menschlichen Haarfollikeln (Kurzen et al., 2004). Kurz zuvor beschrieben Chernyavsky et al. Auffälligkeiten in der Haarfollikelentwicklung von mAChR-knockout-Mäusen für die Isoformen M3 bzw. M4. Mäuse ohne die M3-Isoform des mAChR wiesen am ersten Lebenstag ein im Vergleich zum Wildtyp fortgeschrittenes Haarwachstumsstadium auf. Mäuse ohne die M4-Isoform des mAChR zeigten dagegen im Vergleich zum Wildtyp ein retardiertes Haarwachstumsstadium (Chernyavsky et al., 2004). Das Vorhandensein von ChAT im Bereich des Haarfollikels wurde bisher noch nicht beschrieben. Die hier gezeigten ChAT-eGFP-positiven Zellen fanden sich lediglich im Bereich des Isthmus. Es ist anzunehmen, dass dies dieselben Zellen sind, die auch CHT1 exprimieren. Da Cholin die Zellmembran nicht selbst durchdringen kann, benötigen Zellen, die ACh

produzieren, einen solchen Transporter (Okuda und Haga, 2000). Das Vorhandensein von AChRs spricht ebenso dafür, dass ACh in unmittelbarer Umgebung produziert wird, da ACh durch AChE sehr schnell abgebaut wird und so keine langen Wege zurücklegen kann (Wessler et al., 1999). Erste Hinweise auf die Funktion von ACh in Haarfollikeln geben die Studien mit mAChR-knockout-Mäusen (Chernyavsky et al., 2004). Darauf aufbauend fanden Hasse et al. 2007 heraus, dass die M4-Isoform des mAChR eine wesentliche Rolle für die Kontrolle des Haarzyklus und die Pigmentierung der Haare spielen (Hasse et al., 2007). Aufgrund der Häufigkeit und Vielfalt von AChRs in Haarfollikeln (Kurzen et al., 2004) ist aber noch eine Vielfalt an Funktionen zu erwarten.

Schlussfolgerung

Konjunktivale CCC bilden einen bisher unbekannten cholinergen Zelltyp im Epithel der Konjunktiva. Da sie immunreaktiv für Bestandteile der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade sind, besitzen sie die molekulare Ausstattung zur Chemosensorik. Konjunktivale CCC werden durch CK8 markiert. Da CK8 allerdings einen weiteren Zelltyp im Epithel der Konjunktiva markiert, ist es als Markermolekül für konjunktivale CCC nur bedingt einsetzbar. Spezialisierte cholinerge chemosensorische Zellen mit der Funktion von Wächterzellen wurden in der Säugetiermukosa an verschiedenen Stellen des Körpers beschrieben. Konjunktivale CCC besitzen die molekularen Voraussetzungen, um eine solche Wächterzelle in der Mukosa des Auges zu sein und können aufgrund ihrer Lage im Fornix conjunctivae des medialen Augenwinkels die Tränenflüssigkeit überwachen. Mittels parakriner Signalgebung mit ACh könnten lokale Effekte durch konjunktivale CCC vermittelt werden. Chrna3-positive Nervenfasern bilden subepitheliale Nervenengeflechte, gelangen aber nicht in das Epithel der Konjunktiva. Cholinozeptive Fasern mit anderen nAChR-Untereinheiten könnten dennoch im Epithel der Konjunktiva vorhanden sein und Kontakte zu konjunktivalen CCC etablieren. Intraepitheliale peptiderge sensorische Fasern könnten Becherzellen stimulieren oder eine neurogene Entzündung triggern. Sie liegen zum Teil in enger Nachbarschaft zu konjunktivalen CCC. Eine Stimulation der neurogenen Entzündung oder die Auslösung von protektiven Reflexen durch konjunktivale CCC wäre über diesen Weg möglich. Konjunktivale CCC würden so eine

wichtige Rolle bei Erkrankungen des Auges, wie der Keratokonjunktivitis sicca oder infektiösen Konjunktividen, spielen. Pharmakologische Effekte an konjunktivalen CCC könnten dann therapeutisch genutzt werden und sollten im Hinblick auf Nebenwirkungen berücksichtigt werden.

Im CALT der Maus befinden sich ChAT-eGFP- und α -Gustducin-immunreaktive Zellen. Bei den ChAT-eGFP-immunreaktiven Zellen des CALT handelt es sich wahrscheinlich um Lymphozyten. Es ist sehr wahrscheinlich, dass sie mit den anderen Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems des Auges zusammenwirken. Über Zellen des Immunsystems, die Bestandteile der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade exprimieren, ist bisher noch sehr wenig bekannt. Die Zellen mit α -Gustducin-Immunreaktivität des CALT könnten aber zu einer Subpopulation von Leukozyten gehören, die im Blut zirkulieren und chemosensorische Eigenschaften haben. Eine funktionelle Verwandtschaft mit den chemosensorischen Zellen der Schleimhäute wäre denkbar. Beide Zelltypen könnten Bestandteile eines bisher unbekannten chemosensorischen Systems zur Überwachung des Körpers sein.

5 Zusammenfassung

Vor kurzem wurden spezialisierte cholinerge Zellen, vermutlich Wächterzellen, im Schleimhautepithel verschiedener Säugetiere entdeckt. Sie exprimieren Moleküle der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade zur Erkennung potenziell schädlicher Substanzen, lösen nach Stimulation protektive Reflexe aus und liegen an potenziellen Eintrittspforten für Bakterien (Nase, Tuba auditiva, Trachea, Magen-Darm-Trakt und Urethra). Auch das Auge besitzt engen Kontakt zur Umwelt. Ziel dieser Arbeit war es, die Konjunktiva und die ableitenden Tränenwege der Maus auf das Vorhandensein solcher Zellen zu untersuchen. Mithilfe von zwei verschiedenen Stämmen transgener Mäuse, die unter dem Promotor des Syntheseezyms für Acetylcholin (ChAT) bzw. dem Promotor der nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoruntereinheit $\alpha 3$, eGFP exprimieren, wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Ein bisher unbekannter cholinerges Zelltyp im Epithel der Konjunktiva wurde so identifiziert. Diese Zellen sind immunreaktiv für die Bestandteile der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade α -Gustducin, Phospholipase C β 2 und TRPM5 und enthalten das Zytokeratin 8. Sie befinden sich im Fornix conjunctivae des medialen Augenwinkels, aber nicht in den ableitenden Tränenwegen. Sie werden von CGRP- und Substanz P-immunreaktiven sensorischen Nervenfasern kontaktiert. Weitere Zellen mit ChAT-eGFP-Immunfluoreszenz fanden sich im konjunktiva-assoziierten lymphatischen Gewebe und in Haarfollikeln. Dabei könnte es sich um Immunzellen oder Stammzellen handeln. Im konjunktiva-assoziierten lymphatischen Gewebe der Maus lagen auch vereinzelte nicht-cholinerge Zellen mit α -Gustducin-Immunreaktivität, möglicherweise ebenfalls Immunzellen.

Die bisher unbekannten cholinergen chemosensorischen Zellen im murinen Konjunktivalepithel wurden „konjunktivale CCC“ genannt (conjunctival cholinergic chemosensory cell). Sie können aufgrund ihrer Lage die Tränenflüssigkeit überwachen und besitzen die molekularen Voraussetzungen, um eine Wächterzelle in der Mukosa des Auges zu sein. Sie könnten mittels cholinerges Signale protektive Reflexe wie den Lidschlussreflex auslösen und auch lokale Effekte wie eine neurogene Entzündung triggern. So könnten sie eine wichtige Rolle bei Erkrankungen des Auges spielen und pharmakologische Angriffspunkte bilden.

6 Summary

Specialized cholinergic cells, presumably sentinel cells, were recently identified in the mucosa of various mammalian organs. These cells utilize molecules of the canonical taste transduction signalling cascade to sense potentially harmful substances and initiate protective reflexes upon stimulation. They are located at potential bacterial entry points (nose, tuba auditiva, trachea, gastrointestinal tract and urethra). The eye has close contact to the outer body surface as well. The aim of the study was to search for the presence of this cell type in the conjunctiva and the lacrimal drainage system. Immunohistochemistry was performed on tissues obtained from two different transgenic mouse strains expressing eGFP under the promotor of the acetylcholine synthesizing enzyme, choline acetyltransferase (ChAT), and under the promotor of the nicotinic acetylcholine-receptor subunit $\alpha 3$, respectively. A previously unknown cholinergic cell type in the conjunctival epithelium was identified. These cells are immunoreactive for the molecules of the canonical taste transduction cascade α -gustducin, phospholipase C β 2 and TRPM5, and express cytokeratin 8. They are located in the fornical conjunctiva of the medial angle of eye. They are contacted by CGRP- and substance P-immunoreactive sensory nerve fibers. Other ChAT-eGFP-positive cells were observed in conjunctiva-associated lymphatic tissue and in hair follicles, assumingly cells of the immune system or stem cells. Non-cholinergic α -gustducin-immunoreactive cells were also observed in conjunctiva-associated lymphatic tissue and might also represent immune cells.

The previously unidentified cholinergic chemosensory cells in murine conjunctival epithelium were named conjunctival CCC (cholinergic chemosensory cells). Their location enables them to monitor the lacrimal fluid and they possess the molecular equipment to function as sentinel cells in the ocular mucosa. They possibly initiate protective reflexes such as blinking, or trigger local effects such as neurogenic inflammation by cholinergic signalling. Therefore, they could play an important role in eye disease and might be a pharmaceutically relevant target.

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Für immunhistochemische Markierungen verwendete Primärantikörper <i>m=monoklonal, p=polyklonal</i>	16
Tabelle 2: Verwendete Fluorochrome und Fluoreszenzfilter für die Epifluoreszenzmikroskopie.....	17

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: ChAT-eGFP-Expression in der murinen Konjunktiva; zur besseren Darstellung des Hintergrundes wurden zum Teil zusätzliche Fluoreszenzfilterkombinationen verwendet (A, D: Fluoreszenzfilterkombination für Cy3; C: Fluoreszenzfilterkombination für DAPI) A, B Rundliche ChAT-eGFP- positive Zellen im Epithel der Konjunktiva (Doppelpfeilköpfe); C-E Schlanke, spindelförmige ChAT-eGFP-positive Zellen im Epithel der Konjunktiva (Pfeile); E Fornix conjunctivae mit ChAT-eGFP-positiver Zelle (Pfeil); F Schematische Darstellung des Auges, sagittale Ansicht; schlanke, spindelförmige Zellen im Epithel der Konjunktiva wurden im Bereich der fornikalen Konjunktiva (durch roten Kasten eingrahmt) gefunden; Balken A, B, C, D: 20 µm, Balken E: 50 µm	19
Abbildung 2: ChAT-eGFP-Expression in den ableitenden Tränenwegen und Nasennebenhöhlen. A Schematische Abbildung des Auges und der ableitenden Tränenwege, Coronalebene. B Coronarer Schnitt durch den Schädel einer ChAT- eGFP-Maus (roter Kasten: Tränensack; blauer Kasten: Nasennebenhöhlenschleimhaut). C Tränensack in höherer Vergrößerung ohne ChAT-eGFP-positive Zellen. D SCC der Nasennebenhöhle; Balken A, B: 50 µm, Balken C: 20 µm	20
Abbildung 3: ChAT-eGFP-positive Zellen des CALT (Pfeile); Balken: 20 µm	21
Abbildung 4 Querschnitte durch die Augenlider von ChAT-eGFP-Mäusen; zur besseren Darstellung des Hintergrundes wurde zusätzlich die Fluoreszenzfilterkombination	

für Cy3 verwendet. Haarschaftzellen (Pfeile) exprimieren ChAT. In direkter Nachbarschaft befinden sich die Einmündungen der Talgdrüsen (Pfeilköpfe); Die Lidoberfläche wird durch Sternchen markiert. Die Haarschäfte (Doppelpfeilköpfe) leuchten durch Autofluoreszenz. A Querschnitt des Lids im Bereich der Lidkante mit ChAT-eGFP-positiven Haarbalgzellen (Pfeile). B Querschnitt des Lids; Haarschaft (Doppelpfeilkopf) umgeben von ChAT-eGFP-positiven Haarschaftzellen (Pfeile); Balken A, B: 50 µm22

Abbildung 5: Immunhistochemie der Konjunktiva mit Antikörpern gegen Zytokeratine. A CK5 im Epithel der Mauskonjunktiva, keine Kolokalisation mit ChAT-eGFP-Signal (Pfeilköpfe zeigen auf die Oberfläche der Konjunktiva); B CK10 ist im Epithel der Konjunktiva nicht nachweisbar (Pfeile zeigen auf die Oberfläche der Konjunktiva). C CK10 im verhornten Plattenepithel des Oberlids der Maus (Doppelpfeilköpfe), Autofluoreszenz im Muskel (Sternchen); Balken: 50 µm23

Abbildung 6: Immunhistochemie der Konjunktiva (A-D) und des Thymus (E) mit Antikörpern gegen Zytokeratine. A Schlanke, spindelförmige ChAT-eGFP- und CK8-positive Zelle im fornikalen Abschnitt des Epithels der Mauskonjunktiva (Pfeil). B CK8-positive, ChAT-eGFP-negative Zellen im Epithel der Mauskonjunktiva (Pfeilköpfe); daneben eine ChAT-eGFP-positive, CK8-negative Zelle (Pfeil). C Schlanke, spindelförmige ChAT-eGFP-positive und CK18-negative Epithelzelle der Konjunktiva (Pfeil). D CK14 im Epithel der Konjunktiva (Doppelpfeilköpfe). E ChAT-eGFP- und CK18-positive Zelle im Thymusmark (Pfeil), CK18-immunreaktive Zellen in der Thymusrinde (Pfeilköpfe); Balken: 20 µm.....25

Abbildung 7: Immunhistochemie der ChAT-eGFP-positiven konjunktivalen Epithelzellen mit Antikörpern gegen chemosensorische Zellmarker; schlanke, spindelförmige ChAT-positive Zellen im fornikalen Anteil der Mauskonjunktiva (Pfeile) sind immunreaktiv für Bestandteile der Geschmackstransduktionskaskade. A ChAT- und α -Gustducin-positive Zelle. B ChAT-positive, α -Gustducin-negative Zelle. C ChAT- und PLC β 2-positive Zelle. D ChAT- und TRPM5-positive Zelle; Balken: 20 µm.....26

Abbildung 8: Immunhistochemie der ChAT-eGFP-positiven Zellen des CALT mit chemosensorischen Zellmarkern; Zellen des CALT sind α -Gustducin-positiv. A α -

Gustducin-positive Zellen (Pfeile) und ChAT-positive Zellen (Pfeilköpfe).
B TRPM5 konnte nicht nachgewiesen werden; Balken: 20 μ m.....27

Abbildung 9: Immunhistochemie des Epithels der Konjunktiva mit Markern für peptiderge Neurone an ChAT-eGFP-Mäusen (A, B) und chrna3-eGFP-Mäusen (C). Bei chrna3-eGFP-Mäusen wurden mit einem Antikörper gegen PLC β 2 die Zellen markiert, die Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade exprimieren (C). Die SP-Markierung in Abbildung C wurde mit dem Fluorophor Cy5 gekoppelt. Dieses leuchtet infrarot und erscheint auf dem schwarzweiß-Bild hell. Zur besseren Unterscheidung wurde diesem Signal bei der gleichzeitigen Darstellung aller Signale die Farbe rot zugewiesen. Nervenfasern (Pfeile, Doppelpfeilköpfe) dringen in das Epithel der Mauskonjunktiva ein. A, B CGRP-positive Fasern (Pfeile) kontaktieren schlanke, spindelförmige ChAT-positive Zellen (Pfeilköpfe). C SP-positive Fasern (Pfeile) befinden sich in der Nähe von PLC β 2-positiven Zellen (Pfeilköpfe); Balken A: 10 μ m, Balken B, C: 20 μ m.....28

Abbildung 10: Immunhistochemie des Epithels der Konjunktiva mit Antikörpern gegen CGRP und SP an chrna3-eGFP-Mäusen. Die CGRP-Markierung in Abbildung A und die SP-Markierung in Abbildung B wurden mit dem Fluorophor Cy5 gekoppelt. Dieses leuchtet infrarot und erscheint auf den Schwarzweiß-Bildern hell. Zur besseren Unterscheidung wurde diesem Signal bei der gleichzeitigen Darstellung aller Signale die Farbe rot zugewiesen. Nicht alle PLC β 2-positiven Zellen (Pfeilköpfe) werden von Nervenfasern kontaktiert. A CGRP-positive- (Doppelpfeilköpfe) und chrna3-positive-Nervenfasern (Pfeile) befinden sich unterhalb des Epithels. B SP-positive (Doppelpfeilköpfe) und chrna3-positive Nervenfasern (Pfeile) befinden sich unterhalb des Epithels; Balken: 20 μ m29

Abbildung 11: Parasympathische Nervenfasern innervieren die Meibom-Drüsen des Augenlids der Maus; zur besseren Darstellung des Hintergrundes wurden zusätzlich die Fluoreszenzfilterkombinationen für Cy3 verwendet. A ChAT-eGFP-positive Nervenfasern (Pfeile) befinden sich in den Meibom-Drüsen der ChAT-eGFP-Maus. B Viele chrna3-eGFP-positive Nervenfasern (Pfeilköpfe) durchziehen die Meibom-Drüsen der chrna3-eGFP-Maus; Balken: 20 μ m30

Abbildung 12: Nervenfaserbündel mit ChAT-eGFP-positiven Axonen (Doppelpfeilköpfe) in der Skelettmuskulatur (Sternchen markieren

Skelettmuskelfasern) außerhalb des Augenlides der ChAT-eGFP-Maus; Balken: 20 μm	31
---	----

9 Literaturverzeichnis

- ABRISHAMI, M., HASHEMI, B., ABRISHAMI, M., ABNOUS, K., RAZAVI-AZARKHIAVI, K. & BEHRAVAN, J. 2015. PCR detection and identification of bacterial contaminants in ocular samples from post-operative endophthalmitis. *J Clin Diagn Res*, 9 NC01-3.
- ADEBAYO, A., PARIKH, J. G., MCCORMICK, S. A., SHAH, M. K., HUERTO, R. S., YU, G. & MILMAN, T. 2011. Shifting trends in in vitro antibiotic susceptibilities for common bacterial conjunctival isolates in the last decade at the New York Eye and Ear Infirmary. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 249 111-9.
- ADLER, E., HOON, M. A., MUELLER, K. L., CHANDRASHEKAR, J., RYBA, N. J. & ZUKER, C. S. 2000. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell*, 100 693-702.
- AL-NUAIMI, Y., BAIER, G., WATSON, R. E., CHUONG, C. M. & PAUS, R. 2010. The cycling hair follicle as an ideal systems biology research model. *Exp Dermatol*, 19 707-13.
- AMARA, S. G., JONAS, V., ROSENFELD, M. G., ONG, E. S. & EVANS, R. M. 1982. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature*, 298 240-4.
- ASAN, E. & DRENCKHAHN, D. 2005. Immunocytochemical characterization of two types of microvillar cells in rodent olfactory epithelium. *Histochem Cell Biol*, 123 157-68.
- ASBELL, P. A., COLBY, K. A., DENG, S., MCDONNELL, P., MEISLER, D. M., RAIZMAN, M. B., SHEPPARD, J. D., JR. & SAHM, D. F. 2008. Ocular TRUST: nationwide antimicrobial susceptibility patterns in ocular isolates. *Am J Ophthalmol*, 145 951-958.
- AZARI, A. A. & BARNEY, N. P. 2013. Conjunctivitis: a systematic review of diagnosis and treatment. *JAMA*, 310 1721-9.
- BACHMANOV, A. A. & BEAUCHAMP, G. K. 2007. Taste receptor genes. *Annu Rev Nutr*, 27 389-414.
- BARABINO, S. & DANA, M. R. 2007. Dry eye syndromes. *Chem Immunol Allergy*, 92 176-84.
- BEHRENS, M., MEYERHOF, W., HELLFRITSCH, C. & HOFMANN, T. 2011. Sweet and umami taste: natural products, their chemosensory targets, and beyond. *Angew Chem Int Ed Engl*, 50 2220-42.
- BELMONTE, C., ACOSTA, M. C. & GALLAR, J. 2004. Neural basis of sensation in intact and injured corneas. *Exp Eye Res*, 78 513-25.
- BELMONTE, C. & GALLAR, J. 2011. Cold thermoreceptors, unexpected players in tear production and ocular dryness sensations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52 3888-92.
- BENBIR, G. & KIZILTAN, M. E. 2014. Blink reflex studies in postparalytic facial syndrome and blepharospasm: trigeminal and extratrigeminal somatosensory stimulation. *J Clin Neurophysiol*, 31 535-40.

- BOROVIKOVA, L. V., IVANOVA, S., ZHANG, M., YANG, H., BOTCHKINA, G. I., WATKINS, L. R., WANG, H., ABUMRAD, N., EATON, J. W. & TRACEY, K. J. 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 405 458-62.
- BOULTER, J., O'SHEA-GREENFIELD, A., DUVOISIN, R. M., CONNOLLY, J. G., WADA, E., JENSEN, A., GARDNER, P. D., BALLIVET, M., DENERIS, E. S., MCKINNON, D. & ET AL. 1990. Alpha 3, alpha 5, and beta 4: three members of the rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related gene family form a gene cluster. *J Biol Chem*, 265 4472-82.
- BOYD, R. T., JACOB, M. H., MCEACHERN, A. E., CARON, S. & BERG, D. K. 1991. Nicotinic acetylcholine receptor mRNA in dorsal root ganglion neurons. *J Neurobiol*, 22 1-14.
- BRAGULLA, H. 2009. *Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*, Schattauer Verlag.
- BREIMER, L. H., MACINTYRE, I. & ZAIDI, M. 1988. Peptides from the calcitonin genes: molecular genetics, structure and function. *Biochem J*, 255 377-90.
- BREWITT, H. & SISTANI, F. 2001. Dry eye disease: the scale of the problem. *Surv Ophthalmol*, 45 Suppl 2 S199-202.
- BROCKHOFF, A., BEHRENS, M., ROUDNITZKY, N., APPENDINO, G., AVONTO, C. & MEYERHOF, W. 2011. Receptor agonism and antagonism of dietary bitter compounds. *J Neurosci*, 31 14775-82.
- BRON, A. J., TIFFANY, J. M., GOUVEIA, S. M., YOKOI, N. & VOON, L. W. 2004. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res*, 78 347-60.
- BRON, A. J., TIFFANY, J. M., YOKOI, N. & GOUVEIA, S. M. 2002. Using osmolarity to diagnose dry eye: a compartmental hypothesis and review of our assumptions. *Adv Exp Med Biol*, 506 1087-95.
- BROWN, L. 2007. Resistance to ocular antibiotics: an overview. *Clin Exp Optom*, 90 258-62.
- CARSTAIRS, J. R. 1987. Distribution of calcitonin gene-related peptide receptors in the lung. *Eur J Pharmacol*, 140 357-8.
- CAVUOTO, K., ZUTSHI, D., KARP, C. L., MILLER, D. & FEUER, W. 2008. Update on bacterial conjunctivitis in South Florida. *Ophthalmology*, 115 51-6.
- CHANDRASHEKAR, J., HOON, M. A., RYBA, N. J. & ZUKER, C. S. 2006. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, 444 288-94.
- CHANDRASHEKAR, J., MUELLER, K. L., HOON, M. A., ADLER, E., FENG, L., GUO, W., ZUKER, C. S. & RYBA, N. J. 2000. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*, 100 703-11.
- CHEN, X., BELMONTE, C. & RANG, H. P. 1997. Capsaicin and carbon dioxide act by distinct mechanisms on sensory nerve terminals in the cat cornea. *Pain*, 70 23-9.
- CHERNYAVSKY, A. I., ARREDONDO, J., WESS, J., KARLSSON, E. & GRANDO, S. A. 2004. Novel signaling pathways mediating reciprocal control of keratinocyte migration and wound epithelialization through M3 and M4 muscarinic receptors. *J Cell Biol*, 166 261-72.

- CHODOSH, J., NORDQUIST, R. E. & KENNEDY, R. C. 1998. Comparative anatomy of mammalian conjunctival lymphoid tissue: a putative mucosal immune site. *Dev Comp Immunol*, 22 621-30.
- CHUNG, C. W., TIGGES, M. & STONE, R. A. 1996. Peptidergic innervation of the primate meibomian gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37 238-45.
- COLLISON, D. J., COLEMAN, R. A., JAMES, R. S., CAREY, J. & DUNCAN, G. 2000. Characterization of muscarinic receptors in human lens cells by pharmacologic and molecular techniques. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41 2633-41.
- CONTRERAS-RUIZ, L., GHOSH-MITRA, A., SHATOS, M. A., DARTT, D. A. & MASLI, S. 2013. Modulation of conjunctival goblet cell function by inflammatory cytokines. *Mediators Inflamm*, 2013 636812.
- COOPER, E., COUTURIER, S. & BALLIVET, M. 1991. Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature*, 350 235-8.
- CUELLO, A. C., DEL FIACCO, M. & PAXINOS, G. 1978. The central and peripheral ends of the substance P-containing sensory neurones in the rat trigeminal system. *Brain Res*, 152 499-500.
- DARTT, D. A. 2001. Regulation of lacrimal gland secretion by neurotransmitters and the EGF family of growth factors. *Exp Eye Res*, 73 741-52.
- DARTT, D. A. 2004. Control of mucin production by ocular surface epithelial cells. *Exp Eye Res*, 78 173-85.
- DARTT, D. A. 2009. Neural regulation of lacrimal gland secretory processes: relevance in dry eye diseases. *Prog Retin Eye Res*, 28 155-77.
- DARTT, D. A., MCCARTHY, D. M., MERCER, H. J., KESSLER, T. L., CHUNG, E. H. & ZIESKE, J. D. 1995. Localization of nerves adjacent to goblet cells in rat conjunctiva. *Curr Eye Res*, 14 993-1000.
- DARVESH, S., HOPKINS, D. A. & GEULA, C. 2003. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci*, 4 131-8.
- DECKMANN, K., FILIPSKI, K., KRASTEVA-CHRIST, G., FRONIUS, M., ALTHAUS, M., RAFIQ, A., PAPADAKIS, T., RENNO, L., JURASTOW, I., WESSELS, L., WOLFF, M., SCHUTZ, B., WEIHE, E., CHUBANOV, V., GUDERMANN, T., KLEIN, J., BSCHLEIPFER, T. & KUMMER, W. 2014. Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111 8287-92.
- DECKMANN, K., KRASTEVA-CHRIST, G., RAFIQ, A., HERDEN, C., WICHMANN, J., KNAUF, S., NASSENSTEIN, C., GREVELDING, C. G., DORRESTEIJN, A., CHUBANOV, V., GUDERMANN, T., BSCHLEIPFER, T. & KUMMER, W. 2015. Cholinergic urethral brush cells are widespread throughout placental mammals. *Int Immunopharmacol*.
- The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). 2007. *Ocul Surf*, 5 75-92.
- DENERIS, E. S., CONNOLLY, J., ROGERS, S. W. & DUVOISIN, R. 1991. Pharmacological and functional diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 12 34-40.

- DIEBOLD, Y., RIOS, J. D., HODGES, R. R., RAWE, I. & DARTT, D. A. 2001. Presence of nerves and their receptors in mouse and human conjunctival goblet cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42 2270-82.
- DIMAIO, M. F., KATTAN, M., CIUREA, D., GIL, J. & DISCHE, R. 1990. Brush cells in the human fetal trachea. *Pediatr Pulmonol*, 8 40-4.
- DUKE-ELDER, S. S. W., KENNETH CULLEN 1961. *The Anatomy of the Visual System, Band 2; Band 100*, Kimpton.
- DUNCAN, G. & COLLISON, D. J. 2003. Role of the non-neuronal cholinergic system in the eye: a review. *Life Sci*, 72 2013-9.
- EBERLE, J. A., RICHTER, P., WIDMAYER, P., CHUBANOV, V., GUDERMANN, T. & BREER, H. 2013. Band-like arrangement of taste-like sensory cells at the gastric groove: evidence for paracrine communication. *Front Physiol*, 4 58.
- ELLIS, D. Z., NATHANSON, J. A., RABE, J. & SWEADNER, K. J. 2001. Carbachol and nitric oxide inhibition of Na,K-ATPase activity in bovine ciliary processes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42 2625-31.
- ELSAS, T., EDVINSSON, L., SUNDLER, F. & UDDMAN, R. 1994. Neuronal pathways to the rat conjunctiva revealed by retrograde tracing and immunocytochemistry. *Exp Eye Res*, 58 117-26.
- FINGER, T. E. 2005. Cell types and lineages in taste buds. *Chem Senses*, 30 Suppl 1 i54-5.
- FINGER, T. E., BOTTGER, B., HANSEN, A., ANDERSON, K. T., ALIMOHAMMADI, H. & SILVER, W. L. 2003. Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 8981-6.
- FINGER, T. E. & KINNAMON, S. C. Taste isn't just for taste buds anymore. *F1000 Biol Rep*, 3 20.
- FISCHER, J. A. & BORN, W. 1985. Novel peptides from the calcitonin gene: expression, receptors and biological function. *Peptides*, 6 Suppl 3 265-71.
- FLORES, C. M., DECAMP, R. M., KILO, S., ROGERS, S. W. & HARGREAVES, K. M. 1996. Neuronal nicotinic receptor expression in sensory neurons of the rat trigeminal ganglion: demonstration of alpha3beta4, a novel subtype in the mammalian nervous system. *J Neurosci*, 16 7892-901.
- FORSSMANN, W. G., ITO, S., WEIHE, E., AOKI, A., DYM, M. & FAWCETT, D. W. 1977. An improved perfusion fixation method for the testis. *Anat Rec*, 188 307-14.
- FRAHM, S., SLIMAK, M. A., FERRARESE, L., SANTOS-TORRES, J., ANTOLIN-FONTES, B., AUER, S., FILKIN, S., PONS, S., FONTAINE, J. F., TSETLIN, V., MASKOS, U. & IBANEZ-TALLON, I. 2011. Aversion to nicotine is regulated by the balanced activity of beta4 and alpha5 nicotinic receptor subunits in the medial habenula. *Neuron*, 70 522-35.
- FUCHS, E. 1996. The cytoskeleton and disease: genetic disorders of intermediate filaments. *Annu Rev Genet*, 30 197-231.
- FUCHS, E. & GREEN, H. 1980. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*, 19 1033-42.

- FUJII, T. & KAWASHIMA, K. 2001. An independent non-neuronal cholinergic system in lymphocytes. *Jpn J Pharmacol*, 85 11-5.
- FUJII, T., TSUCHIYA, T., YAMADA, S., FUJIMOTO, K., SUZUKI, T., KASAHARA, T. & KAWASHIMA, K. 1996. Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T cell lines. *J Neurosci Res*, 44 66-72.
- GENZEN, J. R., VAN CLEVE, W. & MCGEHEE, D. S. 2001. Dorsal root ganglion neurons express multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *J Neurophysiol*, 86 1773-82.
- GHATEI, M. A., GU, J., MULDERY, P. K., BLANK, M. A., ALLEN, J. M., MORRISON, J. F., POLAK, J. M. & BLOOM, S. R. 1985. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the female rat urogenital tract. *Peptides*, 6 809-15.
- GIBSON, S. J., POLAK, J. M., BLOOM, S. R., SABATE, I. M., MULDERY, P. M., GHATEI, M. A., MCGREGOR, G. P., MORRISON, J. F., KELLY, J. S., EVANS, R. M. & ET AL. 1984. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. *J Neurosci*, 4 3101-11.
- GIGLIOTTI, F., WILLIAMS, W. T., HAYDEN, F. G., HENDLEY, J. O., BENJAMIN, J., DICKENS, M., GLEASON, C., PERRIELLO, V. A. & WOOD, J. 1981. Etiology of acute conjunctivitis in children. *J Pediatr*, 98 531-6.
- GIMBEL, H. V. 1973. The control of myopia with atropine. *Can J Ophthalmol*, 8 527-32.
- GONCALVES, R. B., COLETTA, R. D., SILVERIO, K. G., BENEVIDES, L., CASATI, M. Z., DA SILVA, J. S. & NOCITI, F. H., JR. 2011. Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms. *Inflamm Res*, 60 409-24.
- GRANDO, S. A., KIST, D. A., QI, M. & DAHL, M. V. 1993. Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. *J Invest Dermatol*, 101 32-6.
- GREEN, B. G. 2012. Chemesthesis and the chemical senses as components of a "chemofensor complex". *Chem Senses*, 37 201-6.
- GREEN, M., APEL, A. & STAPLETON, F. 2008. Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. *Cornea*, 27 22-7.
- GRUEB, M., REINTHAL, E., ROHRBACH, J. M. & BARTZ-SCHMIDT, K. U. 2006. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human corneal epithelium and endothelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 244 1191-5.
- HABERBERGER, R. V., BERNARDINI, N., KRESS, M., HARTMANN, P., LIPS, K. S. & KUMMER, W. 2004. Nicotinic acetylcholine receptor subtypes in nociceptive dorsal root ganglion neurons of the adult rat. *Auton Neurosci*, 113 32-42.
- HABERBERGER, R. V., PFEIL, U., LIPS, K. S. & KUMMER, W. 2002. Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the neuronal and non-neuronal cholinergic system of human and rat skin. *J Invest Dermatol*, 119 943-8.
- HASSE, S., CHERNYAVSKY, A. I., GRANDO, S. A. & PAUS, R. 2007. The M4 muscarinic acetylcholine receptor plays a key role in the control of murine hair follicle cycling and pigmentation. *Life Sci*, 80 2248-52.
- HAZLETT, L. D., JIANG, X. & MCCLELLAN, S. A. 2014. IL-10 function, regulation, and in bacterial keratitis. *J Ocul Pharmacol Ther*, 30 373-80.

- HECKER, A., LIPS, K. S., PFEIL, U., KUMMER, W., PADBERG, W. & GRAU, V. 2006. Peripheral choline acetyltransferase is expressed by monocytes and upregulated during renal allograft rejection in rats. *J Mol Neurosci*, 30 23-4.
- HEINO, P., OKSALA, O., LUHTALA, J. & UUSITALO, H. 1995. Localization of calcitonin gene-related peptide binding sites in the eye of different species. *Curr Eye Res*, 14 783-90.
- HETTINGER, T. P., FORMAKER, B. K. & FRANK, M. E. 2007. Cycloheximide: no ordinary bitter stimulus. *Behav Brain Res*, 180 4-17.
- HIJIYA, K. 1978. Electron microscope study of the alveolar brush cell. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 27 223-7.
- HODGES, R. R., BAIR, J. A., CAROZZA, R. B., LI, D., SHATOS, M. A. & DARTT, D. A. 2012. Signaling pathways used by EGF to stimulate conjunctival goblet cell secretion. *Exp Eye Res*, 103 99-113.
- HÖFER, D. & DRENCKHAHN, D. 1992. Identification of brush cells in the alimentary and respiratory system by antibodies to villin and fimbrin. *Histochemistry*, 98 237-42.
- HÖFER, D. & DRENCKHAHN, D. 1996. Cytoskeletal markers allowing discrimination between brush cells and other epithelial cells of the gut including enteroendocrine cells. *Histochem Cell Biol*, 105 405-12.
- HÖFER, D., SHIN, D. W. & DRENCKHAHN, D. 2000. Identification of cytoskeletal markers for the different microvilli and cell types of the rat vomeronasal sensory epithelium. *J Neurocytol*, 29 147-56.
- HOLZMANN, B. 2013. Modulation of immune responses by the neuropeptide CGRP. *Amino Acids*, 45 1-7.
- HOON, M. A., ADLER, E., LINDEMEIER, J., BATTEY, J. F., RYBA, N. J. & ZUKER, C. S. 1999. Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell*, 96 541-51.
- HOU, W., SUN, X., WANG, Z. & ZHANG, Y. 2012. Biofilm-forming capacity of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* from ocular infections. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53 5624-31.
- HUTTON, E., PALADINI, R. D., YU, Q. C., YEN, M., COULOMBE, P. A. & FUCHS, E. 1998. Functional differences between keratins of stratified and simple epithelia. *J Cell Biol*, 143 487-99.
- ISOMAKI, A. M. 1973. A new cell type (tuft cell) in the gastrointestinal mucosa of the rat. A transmission and scanning electron microscopic study. *Acta Pathol Microbiol Scand A*, Suppl 240:1-35.
- JESTER, J. V., NICOLAIDES, N. & SMITH, R. E. 1981. Meibomian gland studies: histologic and ultrastructural investigations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 20 537-47.
- KANNO, H., HORIKAWA, Y., HODGES, R. R., ZOUKHRI, D., SHATOS, M. A., RIOS, J. D. & DARTT, D. A. 2003. Cholinergic agonists transactivate EGFR and stimulate MAPK to induce goblet cell secretion. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284 C988-98.
- KARJALAINEN, K., TERVO, T. & PALKAMA, A. 1978. Catecholamine-containing and acetylcholinesterase-positive nerve fibres in the rabbit conjunctiva. *Acta Ophthalmol (Copenh)*, 56 911-20.

- KARLIN, A. 2002. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci*, 3 102-14.
- KASKE, S., KRASTEVA, G., KONIG, P., KUMMER, W., HOFMANN, T., GUDERMANN, T. & CHUBANOV, V. 2007. TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC Neurosci*, 8 49.
- KASPER, M., HOFER, D., WOODCOCK-MITCHELL, J., MIGHELI, A., ATTANASIO, A., RUDOLF, T., MULLER, M. & DRENCKHAHN, D. 1994. Colocalization of cytokeratin 18 and villin in type III alveolar cells (brush cells) of the rat lung. *Histochemistry*, 101 57-62.
- KAWASHIMA, K. & FUJII, T. 2000. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther*, 86 29-48.
- KAWASHIMA, K. & FUJII, T. 2003. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. *Life Sci*, 72 2101-9.
- KESSLER, T. L., MERCER, H. J., ZIESKE, J. D., MCCARTHY, D. M. & DARTT, D. A. 1995. Stimulation of goblet cell mucous secretion by activation of nerves in rat conjunctiva. *Curr Eye Res*, 14 985-92.
- KHALIL, M. A. & SONBOL, F. I. 2014. Investigation of biofilm formation on contact eye lenses caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Niger J Clin Pract*, 17 776-84.
- KHAN, I., OSAKA, H., STANISLAUS, S., CALVO, R. M., DEERINCK, T., YAKSH, T. L. & TAYLOR, P. 2003. Nicotinic acetylcholine receptor distribution in relation to spinal neurotransmission pathways. *J Comp Neurol*, 467 44-59.
- KINNAMON, S. C. 2012. Taste receptor signalling - from tongues to lungs. *Acta Physiol (Oxf)*, 204 158-68.
- KIRCH, W., HORNEBER, M. & TAMM, E. R. 1996. Characterization of Meibomian gland innervation in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Anat Embryol (Berl)*, 193 365-75.
- KNOP, E. & KNOP, N. 2003. [Eye-associated lymphoid tissue (EALT) is continuously spread throughout the ocular surface from the lacrimal gland to the lacrimal drainage system]. *Ophthalmologe*, 100 929-42.
- KNOP, E., KNOP, N. & BREWITT, H. 2003. [Dry eye disease as a complex dysregulation of the functional anatomy of the ocular surface. New concepts for understanding dry eye disease]. *Ophthalmologe*, 100 917-28.
- KNOP, N. & KNOP, E. 2000. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41 1270-9.
- KNOP, N. & KNOP, E. 2005. Ultrastructural anatomy of CALT follicles in the rabbit reveals characteristics of M-cells, germinal centres and high endothelial venules. *J Anat*, 207 409-26.
- KRASTEVA, G., CANNING, B. J., HARTMANN, P., VERES, T. Z., PAPADAKIS, T., MUHLFELD, C., SCHLIECKER, K., TALLINI, Y. N., BRAUN, A., HACKSTEIN, H., BAAL, N., WEIHE, E., SCHUTZ, B., KOTLIKOFF, M., IBANEZ-TALLON, I. & KUMMER, W. 2011. Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 9478-83.

- KRASTEVA, G., CANNING, B. J., PAPADAKIS, T. & KUMMER, W. 2012a. Cholinergic brush cells in the trachea mediate respiratory responses to quorum sensing molecules. *Life Sci*, 91 992-6.
- KRASTEVA, G., HARTMANN, P., PAPADAKIS, T., BODENBENNER, M., WESSELS, L., WEIHE, E., SCHUTZ, B., LANGHEINRICH, A. C., CHUBANOV, V., GUDERMANN, T., IBANEZ-TALLON, I. & KUMMER, W. 2012b. Cholinergic chemosensory cells in the auditory tube. *Histochem Cell Biol*, 137 483-97.
- KRASTEVA, G. & KUMMER, W. 2012. "Tasting" the airway lining fluid. *Histochem Cell Biol*, 138 365-83.
- KRENZER, K. L. & FREDDO, T. F. 1997. Cytokeratin expression in normal human bulbar conjunctiva obtained by impression cytology. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38 142-52.
- KUMMER, W., LIPS, K. S. & PFEIL, U. 2008. The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol*, 130 219-34.
- KURZEN, H., BERGER, H., JAGER, C., HARTSCHUH, W., NAHER, H., GRATCHEV, A., GOERDT, S. & DEICHMANN, M. 2004. Phenotypical and molecular profiling of the extraneuronal cholinergic system of the skin. *J Invest Dermatol*, 123 937-49.
- KUSAKABE, Y., YAMAGUCHI, E., TANEMURA, K., KAMEYAMA, K., CHIBA, N., ARAI, S., EMORI, Y. & ABE, K. 1998. Identification of two alpha-subunit species of GTP-binding proteins, Galpha15 and Galphaq, expressed in rat taste buds. *Biochim Biophys Acta*, 1403 265-72.
- LANGLEY, J. N. 1909. On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of 'receptive' substances: Part IV. The effect of curari and of some other substances on the nicotine response of the sartorius and gastrocnemius muscles of the frog. *J Physiol*, 39 235-95.
- LATKANY, R. 2008. Dry eyes: etiology and management. *Curr Opin Ophthalmol*, 19 287-91.
- LEDoux, M. S., ZHOU, Q., MURPHY, R. B., GREENE, M. L. & RYAN, P. 2001. Parasympathetic innervation of the meibomian glands in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42 2434-41.
- LEE, R. J., XIONG, G., KOFONOW, J. M., CHEN, B., LYSSENKO, A., JIANG, P., ABRAHAM, V., DOGHARAMJI, L., ADAPPA, N. D., PALMER, J. N., KENNEDY, D. W., BEAUCHAMP, G. K., DOULIAS, P. T., ISCHIROPOULOS, H., KREINDLER, J. L., REED, D. R. & COHEN, N. A. 2012. T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *J Clin Invest*, 122 4145-59.
- LEE, S. Y., OH, J. H., KIM, J. C., KIM, Y. H., KIM, S. H. & CHOI, J. W. 2003. In vivo conjunctival reconstruction using modified PLGA grafts for decreased scar formation and contraction. *Biomaterials*, 24 5049-59.
- LEMP, M. A. & WEILER, H. H. 1983. How do tears exit? *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 24 619-22.
- LIMAN, E. R. 2007. TRPM5 and taste transduction. *Handb Exp Pharmacol*, 287-98.
- LIMAN, E. R., ZHANG, Y. V. & MONTELL, C. 2014. Peripheral coding of taste. *Neuron*, 81 984-1000.

- LIND, G. J. & CAVANAGH, H. D. 1993. Nuclear muscarinic acetylcholine receptors in corneal cells from rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34 2943-52.
- LIND, G. J., CHEW, S. J., MARZANI, D. & WALLMAN, J. 1998. Muscarinic acetylcholine receptor antagonists inhibit chick scleral chondrocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39 2217-31.
- LIPS, K. S., VOLK, C., SCHMITT, B. M., PFEIL, U., ARNDT, P., MISKA, D., ERMERT, L., KUMMER, W. & KOEPESELL, H. 2005. Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 33 79-88.
- LLOYD, A. W., FARAGHER, R. G. & DENYER, S. P. 2001. Ocular biomaterials and implants. *Biomaterials*, 22 769-85.
- LUCIANO, L. & REALE, E. 1979. A new morphological aspect of the brush cells of the mouse gallbladder epithelium. *Cell Tissue Res*, 201 37-44.
- LUCIANO, L. & REALE, E. 1997. Presence of brush cells in the mouse gallbladder. *Microsc Res Tech*, 38 598-608.
- LUCIANO, L., REALE, E. & RUSKA, H. 1968a. Über eine "chemorezeptive" Sinneszelle in der Trachea der Ratte. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 85 350-75.
- LUCIANO, L., REALE, E. & RUSKA, H. 1968b. Über eine glykogenhaltige Burstenzelle im Rectum der Ratte. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 91 153-8.
- LUCIANO, L., REALE, E. & RUSKA, H. 1969. Bürstenzellen im Alveolarepithel der Rattenlunge. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 95 198-201.
- LUHTALA, J., PALKAMA, A. & UUSITALO, H. 1991. Calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerve fibers in the rat conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 32 640-5.
- LUHTALA, J. & UUSITALO, H. 1991. The distribution and origin of substance P immunoreactive nerve fibres in the rat conjunctiva. *Exp Eye Res*, 53 641-6.
- MABLEY, J., GORDON, S. & PACHER, P. 2011. Nicotine exerts an anti-inflammatory effect in a murine model of acute lung injury. *Inflammation*, 34 231-7.
- MACINTOSH, S. R. 1974. The innervation of the conjunctiva in monkeys. An electron microscopic and nerve degeneration study. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*, 192 105-16.
- MALKI, A., FIEDLER, J., FRICKE, K., BALLWEG, I., PFAFFL, M. W. & KRAUTWURST, D. 2015. Class I odorant receptors, TAS1R and TAS2R taste receptors, are markers for subpopulations of circulating leukocytes. *J Leukoc Biol*, 97 533-45.
- MANTELLI, F., MICERA, A., SACCHETTI, M. & BONINI, S. 2010. Neurogenic inflammation of the ocular surface. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 10 498-504.
- MAO, D., YASUDA, R. P., FAN, H., WOLFE, B. B. & KELLAR, K. J. 2006. Heterogeneity of nicotinic cholinergic receptors in rat superior cervical and nodose Ganglia. *Mol Pharmacol*, 70 1693-9.
- MARGOLSKEE, R. F. 2002. Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *J Biol Chem*, 277 1-4.

- MCLAUGHLIN, S. K., MCKINNON, P. J. & MARGOLSKEE, R. F. 1992. Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature*, 357 563-9.
- MCLAUGHLIN, S. K., MCKINNON, P. J., ROBICHON, A., SPICKOFSKY, N. & MARGOLSKEE, R. F. 1993. Gustducin and transducin: a tale of two G proteins. *Ciba Found Symp*, 179 186-96; discussion 196-200.
- MENG, I. D. & KUROSE, M. 2013. The role of corneal afferent neurons in regulating tears under normal and dry eye conditions. *Exp Eye Res*, 117 79-87.
- MERIGO, F., BENATI, D., TIZZANO, M., OSCULATI, F. & SBARBATI, A. 2005. alpha-Gustducin immunoreactivity in the airways. *Cell Tissue Res*, 319 211-9.
- MERJAVA, S., NEUWIRTH, A., TANZEROVA, M. & JIRSOVA, K. 2011. The spectrum of cytokeratins expressed in the adult human cornea, limbus and perilimbal conjunctiva. *Histol Histopathol*, 26 323-31.
- MESSMER, E. M. 2012. Bakterielle Konjunktivitis--Update zu Diagnose und Therapie [Bacterial conjunctivitis--diagnosis and therapy update]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 229 529-33.
- MIKULSKI, Z., HARTMANN, P., JOSITSCH, G., ZASLONA, Z., LIPS, K. S., PFEIL, U., KURZEN, H., LOHMEYER, J., CLAUSS, W. G., GRAU, V., FRONIUS, M. & KUMMER, W. 2010. Nicotinic receptors on rat alveolar macrophages dampen ATP-induced increase in cytosolic calcium concentration. *Respir Res*, 11 133.
- MILLER, A., COSTA, M., FURNESS, J. B. & CHUBB, I. W. 1981. Substance P immunoreactive sensory nerves supply the rat iris and cornea. *Neurosci Lett*, 23 243-9.
- MOLL, R. 1993. Cytokeratine als Differenzierungsmarker. Expressionsprofile von Epithelien und epithelialen Tumoren *Veroff Pathol*, 142 1-197.
- MOLL, R., DIVO, M. & LANGBEIN, L. 2008. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*, 129 705-33.
- MOLL, R., FRANKE, W. W., SCHILLER, D. L., GEIGER, B. & KREPLER, R. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31 11-24.
- MOREL, N. 2003. Neurotransmitter release: the dark side of the vacuolar-H⁺ATPase. *Biol Cell*, 95 453-7.
- MULDERRY, P. K., GHATEI, M. A., RODRIGO, J., ALLEN, J. M., ROSENFELD, M. G., POLAK, J. M. & BLOOM, S. R. 1985. Calcitonin gene-related peptide in cardiovascular tissues of the rat. *Neuroscience*, 14 947-54.
- NANDIGAMA, R., IBANEZ-TALLON, I., LIPS, K. S., SCHWANTES, U., KUMMER, W. & BSCHLEIPFER, T. 2013. Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA in mouse bladder afferent neurons. *Neuroscience*, 229 27-35.
- NUCCI, C., ARTINI, M., PASMORE, M., MISSIROLI, F., COSTERTON, J. W. & SELAN, L. 2005. A microbiological and confocal microscopy study documenting a slime-producing *Staphylococcus epidermidis* isolated from a nylon corneal suture of a patient with antibiotic-resistant endophthalmitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 243 951-4.
- ODUNTAN, O. & RUSKELL, G. 1992. The source of sensory fibres of the inferior conjunctiva of monkeys. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 230 258-63.

- OGURA, T., KROSNOWSKI, K., ZHANG, L., BEKKERMAN, M. & LIN, W. 2010. Chemoreception regulates chemical access to mouse vomeronasal organ: role of solitary chemosensory cells. *PLoS One*, 5 e11924.
- OHYAMA, M. 2007. Hair follicle bulge: a fascinating reservoir of epithelial stem cells. *J Dermatol Sci*, 46 81-9.
- OKUDA, T. & HAGA, T. 2000. Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *FEBS Lett*, 484 92-7.
- ONGERBOER DE VISSER, B. W. & KUYPERS, H. G. 1978. Late blink reflex changes in lateral medullary lesions. An electrophysiological and neuro-anatomical study of Wallenberg's Syndrome. *Brain*, 101 285-94.
- PACHIGOLLA, G., BLOMQUIST, P. & CAVANAGH, H. D. 2007. Microbial keratitis pathogens and antibiotic susceptibilities: a 5-year review of cases at an urban county hospital in north Texas. *Eye Contact Lens*, 33 45-9.
- PANNECK, A. R., RAFIQ, A., SCHUTZ, B., SOULTANOVA, A., DECKMANN, K., CHUBANOV, V., GUDERMANN, T., WEIHE, E., KRASTEVA-CHRIST, G., GRAU, V., DEL REY, A. & KUMMER, W. 2014. Cholinergic epithelial cell with chemosensory traits in murine thymic medulla. *Cell Tissue Res*, 358 737-48.
- PATRICK, J., BOULTER, J., GOLDMAN, D., GARDNER, P. & HEINEMANN, S. 1987. Molecular biology of nicotinic acetylcholine receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 505 194-207.
- PAUS, R. & COTSARELIS, G. 1999. The biology of hair follicles. *N Engl J Med*, 341 491-7.
- PERRA, M. T., SERRA, A., SIRIGU, P. & TURNO, F. 1996. Histochemical demonstration of acetylcholinesterase activity in human Meibomian glands. *Eur J Histochem*, 40 39-44.
- PREIBISZ, J. J. 1993. Calcitonin gene-related peptide and regulation of human cardiovascular homeostasis. *Am J Hypertens*, 6 434-50.
- REARDON, C., DUNCAN, G. S., BRUSTLE, A., BRENNER, D., TUSCHE, M. W., OLOFSSON, P. S., ROSAS-BALLINA, M., TRACEY, K. J. & MAK, T. W. 2013. Lymphocyte-derived ACh regulates local innate but not adaptive immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 1410-5.
- REINPRAYOON, U., SITTHANON, S., KASETSUWAN, N. & CHONGTHALEONG, A. 2015. Bacteriological findings and antimicrobial susceptibility pattern of isolated pathogens from visual threatening ocular infections. *J Med Assoc Thai*, 98 Suppl 1 S70-6.
- RHODIN, J. & DALHAMN, T. 1956. Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 44 345-412.
- RHODIN, J. A. 1966. The ciliated cell. Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa. *Am Rev Respir Dis*, 93 Suppl:1-15.
- RICHARDSON, J. D. & VASKO, M. R. 2002. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, 302 839-45.
- RIMPEL, J., GEYER, D. & HOPF, H. C. 1982. Changes in the blink responses to combined trigeminal, acoustic and visual repetitive stimulation, studied in the human subject. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 54 552-60.

- RINNER, I., KAWASHIMA, K. & SCHAUENSTEIN, K. 1998. Rat lymphocytes produce and secrete acetylcholine in dependence of differentiation and activation. *J Neuroimmunol*, 81 31-7.
- ROOP, D. R., HAWLEY-NELSON, P., CHENG, C. K. & YUSPA, S. H. 1983. Keratin gene expression in mouse epidermis and cultured epidermal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80 716-20.
- ROSENBERRY, T. L. 1975. Acetylcholinesterase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 43 103-218.
- ROSENFELD, M. G., AMARA, S. G. & EVANS, R. M. 1984. Alternative RNA processing: determining neuronal phenotype. *Science*, 225 1315-20.
- RUIZ-AVILA, L., MCLAUGHLIN, S. K., WILDMAN, D., MCKINNON, P. J., ROBICHON, A., SPICKOFSKY, N. & MARGOLSKEE, R. F. 1995. Coupling of bitter receptor to phosphodiesterase through transducin in taste receptor cells. *Nature*, 376 80-5.
- RUSKELL, G. L. 1971. The distribution of autonomic post-ganglionic nerve fibres to the lacrimal gland in monkeys. *J Anat*, 109 229-42.
- RUSKELL, G. L. 1985. Innervation of the conjunctiva. *Trans Ophthalmol Soc U K*, 104 (Pt 4) 390-5.
- SAKIMOTO, T., SHOJI, J., INADA, N., SAITO, K., IWASAKI, Y. & SAWA, M. 2002. Histological study of conjunctiva-associated lymphoid tissue in mouse. *Jpn J Ophthalmol*, 46 364-69.
- SATO, E., KOYAMA, S., OKUBO, Y., KUBO, K. & SEKIGUCHI, M. 1998. Acetylcholine stimulates alveolar macrophages to release inflammatory cell chemotactic activity. *Am J Physiol*, 274 L970-9.
- SATO, K. Z., FUJII, T., WATANABE, Y., YAMADA, S., ANDO, T., KAZUKO, F. & KAWASHIMA, K. 1999. Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines. *Neurosci Lett*, 266 17-20.
- SAUNDERS, C. J., CHRISTENSEN, M., FINGER, T. E. & TIZZANO, M. 2014. Cholinergic neurotransmission links solitary chemosensory cells to nasal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111 6075-80.
- SBARBATI, A. & OSCULATI, F. 2005. A new fate for old cells: brush cells and related elements. *J Anat*, 206 349-58.
- SCHAUER, A., OSBORN, M., WEBER, K. & ALTMANNNSBERGER, M. 1984. Antibodies to different intermediate filaments as histogenetic tumormarkers. *Acta Histochem Suppl*, 29 129-36.
- SCHILLER, D. L., FRANKE, W. W. & GEIGER, B. 1982. A subfamily of relatively large and basic cytokeratin polypeptides as defined by peptide mapping is represented by one or several polypeptides in epithelial cells. *EMBO J*, 1 761-9.
- SCHWEIZER, J., BOWDEN, P. E., COULOMBE, P. A., LANGBEIN, L., LANE, E. B., MAGIN, T. M., MALTAIS, L., OMARY, M. B., PARRY, D. A., ROGERS, M. A. & WRIGHT, M. W. 2006. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol*, 174 169-74.

- SCHWEIZER, J. & WINTER, H. 1982. Keratin polypeptide analysis in fetal and in terminally differentiating newborn mouse epidermis. *Differentiation*, 22 19-24.
- SEIFERT, P. & SPITZNAS, M. 1996. Immunocytochemical and ultrastructural evaluation of the distribution of nervous tissue and neuropeptides in the meibomian gland. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 234 648-56.
- SEIFERT, P. & SPITZNAS, M. 1999. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) innervation of the human eyelid glands. *Exp Eye Res*, 68 685-92.
- SEVERINI, C., IMPROTA, G., FALCONIERI-ERSPAMER, G., SALVADORI, S. & ERSPAMER, V. 2002. The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev*, 54 285-322.
- SHAFFER, R. N. & HETHERINGTON, J., JR. 1966. Anticholinesterase drugs and cataracts. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 64 204-16.
- SHARMA, S. 2011. Antibiotic resistance in ocular bacterial pathogens. *Indian J Med Microbiol*, 29 218-22.
- SIMONS, E. & SMITH, P. G. 1994. Sensory and autonomic innervation of the rat eyelid: neuronal origins and peptide phenotypes. *J Chem Neuroanat*, 7 35-47.
- SKOK, M. V., VOITENKO, L. P., VOITENKO, S. V., LYKHMUS, E. Y., KALASHNIK, E. N., LITVIN, T. I., TZARTOS, S. J. & SKOK, V. I. 1999. Alpha subunit composition of nicotinic acetylcholine receptors in the rat autonomic ganglia neurons as determined with subunit-specific anti-alpha(181-192) peptide antibodies. *Neuroscience*, 93 1427-36.
- SKOK, V. I. 2002. Nicotinic acetylcholine receptors in autonomic ganglia. *Auton Neurosci*, 97 1-11.
- SMITH, A. F. & WAYCASTER, C. 2009. Estimate of the direct and indirect annual cost of bacterial conjunctivitis in the United States. *BMC Ophthalmol*, 9 13.
- SOULTANOVA, A., VOIGT, A., CHUBANOV, V., GUDERMANN, T., MEYERHOF, W., BOEHM, U. & KUMMER, W. 2015. Cholinergic chemosensory cells of the thymic medulla express the bitter receptor Tas2r131. *Int Immunopharmacol*.
- SPENCER, R. C. 1996. Predominant pathogens found in the European Prevalence of Infection in Intensive Care Study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 15 281-5.
- STARKE, K. 1996. Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Heidelberg: Spektrum.
- STEVEN, P. & GEBERT, A. 2009. Conjunctiva-associated lymphoid tissue - current knowledge, animal models and experimental prospects. *Ophthalmic Res*, 42 2-8.
- STEVEN, P., RUPP, J., HUTTMANN, G., KOOP, N., LENSING, C., LAQUA, H. & GEBERT, A. 2008. Experimental induction and three-dimensional two-photon imaging of conjunctiva-associated lymphoid tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49 1512-7.
- STREILEIN, J. W., OKAMOTO, S., SANO, Y. & TAYLOR, A. W. 2000. Neural control of ocular immune privilege. *Ann N Y Acad Sci*, 917 297-306.
- STROUD, R. M., MCCARTHY, M. P. & SHUSTER, M. 1990. Nicotinic acetylcholine receptor superfamily of ligand-gated ion channels. *Biochemistry*, 29 11009-23.
- SUNDSTROM, B. E. & STIGBRAND, T. I. 1994. Cytokeratins and tissue polypeptide antigen. *Int J Biol Markers*, 9 102-8.

- SZCZOTKA-FLYNN, L. B., IMAMURA, Y., CHANDRA, J., YU, C., MUKHERJEE, P. K., PEARLMAN, E. & GHANNOUM, M. A. 2009. Increased resistance of contact lens-related bacterial biofilms to antimicrobial activity of soft contact lens care solutions. *Cornea*, 28 918-26.
- TAIRA, K. & SHIBASAKI, S. 1978. A fine structure study of the non-ciliated cells in the mouse tracheal epithelium with special reference to the relation of "brush cells" and "endocrine cells". *Arch Histol Jpn*, 41 351-66.
- TALLINI, Y. N., SHUI, B., GREENE, K. S., DENG, K. Y., DORAN, R., FISHER, P. J., ZIPFEL, W. & KOTLIKOFF, M. I. 2006. BAC transgenic mice express enhanced green fluorescent protein in central and peripheral cholinergic neurons. *Physiol Genomics*, 27 391-7.
- TANELIAN, D. L. 1991. Cholinergic activation of a population of corneal afferent nerves. *Exp Brain Res*, 86 414-20.
- TERENGHI, G., POLAK, J. M., GHATEI, M. A., MULDERY, P. K., BUTLER, J. M., UNGER, W. G. & BLOOM, S. R. 1985. Distribution and origin of calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the sensory innervation of the mammalian eye. *J Comp Neurol*, 233 506-16.
- TIFFANY, J. M. 2008. The normal tear film. *Dev Ophthalmol*, 41 1-20.
- TIPPINS, J. R. 1986. CGRP: a novel neuropeptide from the calcitonin gene is the most potent vasodilator known. *J Hypertens Suppl*, 4 S102-5.
- TIZZANO, M., CRISTOFOLETTI, M., SBARBATI, A. & FINGER, T. E. 2011. Expression of taste receptors in solitary chemosensory cells of rodent airways. *BMC Pulm Med*, 11 3.
- TIZZANO, M., GULBRANSEN, B. D., VANDENBEUCH, A., CLAPP, T. R., HERMAN, J. P., SIBHATU, H. M., CHURCHILL, M. E., SILVER, W. L., KINNAMON, S. C. & FINGER, T. E. 2009. Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 3210-5.
- TOSHIDA, H., NGUYEN, D. H., BEUERMAN, R. W. & MURAKAMI, A. 2007. Evaluation of novel dry eye model: preganglionic parasympathetic denervation in rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48 4468-75.
- TREGGEAR, G. W., NIALL, H. D., POTTS, J. T., JR., LEEMAN, S. E. & CHANG, M. M. 1971. Synthesis of substance P. *Nat New Biol*, 232 87-9.
- TREUTING, P. W., R; TU, DC; PHAN, I 2012. *Comparative anatomy and histology. A mouse and human atlas*, Academic Press.
- TSCHOPP, F. A., HENKE, H., PETERMANN, J. B., TOBLER, P. H., JANZER, R., HOKFELT, T., LUNDBERG, J. M., CUELLO, C. & FISCHER, J. A. 1985. Calcitonin gene-related peptide and its binding sites in the human central nervous system and pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82 248-52.
- TSENG, S. C., HUANG, A. J. & SUTTER, D. 1987. Purification and characterization of rabbit ocular mucin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 28 1473-82.
- VAN ALPHEN, G. W. 1957. Acetylcholine synthesis in corneal epithelium. *AMA Arch Ophthalmol*, 58 449-51.
- VENTURI, V. & SUBRAMONI, S. 2009. Future research trends in the major chemical language of bacteria. *HFSP J*, 3 105-16.

- VERNINO, S., HOPKINS, S. & WANG, Z. 2009. Autonomic ganglia, acetylcholine receptor antibodies, and autoimmune ganglionopathy. *Auton Neurosci*, 146 3-7.
- VINCENT, J. L., BIHARI, D. J., SUTER, P. M., BRUINING, H. A., WHITE, J., NICOLAS-CHANOIN, M. H., WOLFF, M., SPENCER, R. C. & HEMMER, M. 1995. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA*, 274 639-44.
- WADA, E., MCKINNON, D., HEINEMANN, S., PATRICK, J. & SWANSON, L. W. 1990. The distribution of mRNA encoded by a new member of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene family (alpha 5) in the rat central nervous system. *Brain Res*, 526 45-53.
- WADA, E., WADA, K., BOULTER, J., DENERIS, E., HEINEMANN, S., PATRICK, J. & SWANSON, L. W. 1989. Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol*, 284 314-35.
- WALDEYER, A. 2012. *Waldeyer - Anatomie des Menschen: Lehrbuch und Atlas in einem Band*, Walter de Gruyter.
- WANG, H., YU, M., OCHANI, M., AMELLA, C. A., TANOVIC, M., SUSARLA, S., LI, J. H., WANG, H., YANG, H., ULLOA, L., AL-ABED, Y., CZURA, C. J. & TRACEY, K. J. 2003. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, 421 384-8.
- WANG, N., ORR-URTREGER, A. & KORCZYN, A. D. 2002. The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in autonomic ganglia: lessons from knockout mice. *Prog Neurobiol*, 68 341-60.
- WEBER, D. J., RAASCH, R. & RUTALA, W. A. 1999. Nosocomial infections in the ICU: the growing importance of antibiotic-resistant pathogens. *Chest*, 115 34S-41S.
- WEISS, A., BRINSER, J. H. & NAZAR-STEWART, V. 1993. Acute conjunctivitis in childhood. *J Pediatr*, 122 10-4.
- WELSCH, U. 2003. *Lehrbuch Histologie*, Urban & Fischer.
- WESSLER, I. & KIRKPATRICK, C. J. 2008. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol*, 154 1558-71.
- WESSLER, I., KIRKPATRICK, C. J. & RACKE, K. 1999. The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26 198-205.
- WESSLER, I., ROTH, E., DEUTSCH, C., BROCKERHOFF, P., BITTINGER, F., KIRKPATRICK, C. J. & KILBINGER, H. 2001. Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *Br J Pharmacol*, 134 951-6.
- WIEDERHOLT, M., SCHAFER, R., WAGNER, U. & LEPPLE-WIENHUES, A. 1996. Contractile response of the isolated trabecular meshwork and ciliary muscle to cholinergic and adrenergic agents. *Ger J Ophthalmol*, 5 146-53.
- WILLIAMS, J. D. & COOPER, J. R. 1965. Acetylcholine in bovine corneal epithelium. *Biochem Pharmacol*, 14 1286-9.

- WILSON, W. S. & MCKEAN, C. E. 1986. Regional distribution of acetylcholine and associated enzymes and their regeneration in corneal epithelium. *Exp Eye Res*, 43 235-42.
- WIMALAWANSA, S. J. 1996. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev*, 17 533-85.
- WINTER, H., SCHWEIZER, J. & GOERTTLER, K. 1980. Keratins as markers of malignancy in mouse epidermal tumors. *Carcinogenesis*, 1 391-8.
- WONG, G. T., GANNON, K. S. & MARGOLSKEE, R. F. 1996. Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature*, 381 796-800.
- WOTHERSPOON, A. C., HARDMAN-LEA, S. & ISAACSON, P. G. 1994. Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) in the human conjunctiva. *J Pathol*, 174 33-7.
- XU, W., GELBER, S., ORR-URTREGER, A., ARMSTRONG, D., LEWIS, R. A., OU, C. N., PATRICK, J., ROLE, L., DE BIASI, M. & BEAUDET, A. L. 1999. Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the $\alpha 3$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 5746-51.
- YARWOOD, J. M., BARTELS, D. J., VOLPER, E. M. & GREENBERG, E. P. 2004. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol*, 186 1838-50.
- YASUI, T., KARITA, K., IZUMI, H. & TAMAI, M. 1997. Correlation between vasodilatation and secretion in the lacrimal gland elicited by stimulation of the cornea and facial nerve root of the cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38 2476-82.
- ZAIDI, M., BREIMER, L. H. & MACINTYRE, I. 1987. Biology of peptides from the calcitonin genes. *Q J Exp Physiol*, 72 371-408.
- ZEGANS, M. E., BECKER, H. I., BUDZIK, J. & O'TOOLE, G. 2002. The role of bacterial biofilms in ocular infections. *DNA Cell Biol*, 21 415-20.
- ZHANG, Y., HOON, M. A., CHANDRASHEKAR, J., MUELLER, K. L., COOK, B., WU, D., ZUKER, C. S. & RYBA, N. J. 2003. Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*, 112 293-301.
- ZHANG, Z., ZHAO, Z., MARGOLSKEE, R. & LIMAN, E. 2007. The transduction channel TRPM5 is gated by intracellular calcium in taste cells. *J Neurosci*, 27 5777-86.

10 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

WIEDERHOLD, S., PAPADAKIS, T., CHUBANOV, V., GUDERMANN, T., KRASTEVA-CHRIST, G. KUMMER, W. 2015. A novel cholinergic epithelial cell with chemosensory traits in the murine conjunctiva. *Int Immunopharmacol.* 29 45-50

Abstracts

WIEDERHOLD, S., KRASTEVA-CHRIST G., KUMMER W. 2015. A novel cholinergic chemosensory cell in murine conjunctiva. DOI 10.3377/anatges.2015.00224; 31. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg.

11 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

12 Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre nicht zustande gekommen ohne breite Unterstützung und Hilfe.

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Kummer für die Überlassung des Themas, des Arbeitsplatzes, für seine jederzeit gewährte Hilfsbereitschaft, sowie sein unermüdliches Engagement bei allen Fragestellungen und während der gesamten Zusammenarbeit. Vor allem die schnelle und unkomplizierte Korrektur der Niederschrift meiner Arbeit hat mir das Schreiben erleichtert und dazu beigetragen, dass es mir sehr viel Freude bereitet hat.

Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ für die Möglichkeit, diese Promotion während meiner Promotionszeit zum Dr. med. zu beginnen. Weiterhin danke ich ihr auch für die jederzeit gewährte Hilfe auch bezüglich dieser Promotion und für ihr unermüdliches Engagement während der gesamten Zusammenarbeit.

Tamara Papadakis danke ich für das Einarbeiten in diverse Methoden, ihre unermüdliche Hilfe und Unterstützung im Labor bei den vielen histologischen Schnitten und Immunos und ihre Freundschaft, die auch zu vielen interessanten und tiefgründigen privaten Gesprächen geführt hat.

Martin Bodenbenner danke ich dafür, dass ich jederzeit alle möglichen und unmöglichen Fragen stellen durfte und Hilfe für jedes noch so kleine oder große Problem bekam.

Karola Michel danke ich für die große Hilfe und die vielen Tipps bei der Erstellung meiner Bilder und auch für die netten Gespräche in den Pausen.

Patricia Berger danke ich ebenso für ihre liebevolle Unterstützung und große Hilfe bei den vielen kleinen und großen Problemen des Doktorandendaseins, auch in administrativer Hinsicht.

Meinen Kollegen und Freunden möchte ich danken, vor allem Petra M., Silke W., Innokentij J., Amir R., Klaus D., Gerd M., Gerhard K. und allen anderen, die nicht namentlich erwähnt sind, für die wunderbare und lustige Zeit im Institut, aber auch für die liebevolle Unterstützung in schweren Zeiten.

Alexandra P. danke ich dafür, dass sie mich in diese Arbeitsgruppe geführt hat und mir bei Fragen und Problemen immer beiseite stand.

Ich danke meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben. Meinem Vater danke ich auch, dass er mich immer dazu angetrieben hat mein Bestes zu geben und mich in jeder Hinsicht unterstützt hat. Ich danke auch meinem Bruder, der Freud und Leid einer Promotion nur zu gut selbst kennt.

Meiner lieben Eva, für ihre Freundschaft und Unterstützung und dafür, dass sie immer an mich glaubt.

Meinem Freund Marcus und seiner Familie für die Unterstützung und all die schönen und willkommenen Momente der Ablenkung.

Allen meinen Freunden dafür, dass sie meine geistige und körperliche Abwesenheit so lange ertragen haben und dennoch immer für mich da waren.

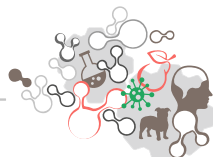
Mein Dank gilt auch meiner Familie in Brasilien und Portugal, die so lange auf meine Besuche verzichten musste, aber mich stets mit Gebeten begleitet hat.

Im besonderen Maße danke ich Gott, der diese Gebete erhört und mich durch diese Zeit ständig begleitet hat.

Zuletzt möchte ich allen danken, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6445-7



9 17 8 3 8 3 5 19 6 4 4 5 7 1